

博 士 論 文

d-ROMs・BAP を用いた神経発達障害の酸化ストレス評価と臨床応用への検討に関する研究

北 岡 泰 介

令和三年

博 士 論 文

d-ROMs・BAP を用いた神経発達障害の酸化ストレス評価と臨床応用への検討に関する研究

徳島文理大学大学院薬学研究科

薬学専攻 博士課程

北 岡 泰 介

指導教授 京谷庄二郎

令和三年提出

略号一覧	1
緒論	3
第一章 定型発達児における酸化ストレスマーカーd-ROMs・BAP 値の評価	
第一節 序説	6
第二節 方法	8
第三節 対象者背景	16
第四節 年齢群別における各測定値の性差	18
第五節 各測定値と年齢の関係	20
第六節 小括	24
第二章 Autism spectrum disorder における酸化ストレスマーカーd-ROMs・BAP 値の評価	
第一節 序説	27
第二節 方法	29
第三節 対象者背景	33
第四節 各測定値と性差比較	34
第五節 知的機能と各測定値との関係	35
第六節 各年齢群における TD 児と ASD 児との各測定値の比較	36
第七節 PARS-TR スコアと d-ROMs 値・BAP 値との関係	39
第八節 小括	42
第三章 Attention deficit hyperactivity disorder を併存する Autism spectrum disorder における薬物治療前後の酸化ストレスマーカーd-ROMs・BAP 値の評価	
第一節 序説	45
第二節 方法	47
第三節 対象者背景	50
第四節 治療前後の各測定値の変化	54
第五節 主観的評価と客観的評価の治療前後の変化の関係	56
第六節 小括	59

総括.....	63
参考文献.....	65
発表論文.....	79
謝辞.....	80

略語一覽

8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
ADHD	attention deficit hyperactivity disorder
ADHD-RS	attention deficit hyperactivity disorder–rating scale
ARP	aripiprazole
ASD	autism spectrum disorder
AST	aspartate aminotransferase
ATX	atomoxetine hydrochloride
BAP	biological antioxidant potential
CRP	C-reactive protein
DNA	deoxyribonucleic acid
d-ROMs	reactive oxygen metabolites
DSM	diagnostic and statistical manual of mental disorders
ESR	electron spin resonance
GST	glutathione S-transferase
GXR	guanfacine hydrochloride
IQ	Intelligence quotient
MPH	methylphenidate hydrochloride
NOS	nitric oxide synthase
PARS-TR	parent-interview autism spectrum disorder rating scales–text revision
PDD	pervasive developmental disorder
PON-1	paraoxonase-1
RIS	risperidone
RML	ramelteon
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxide dismutase
STL	sertraline hydrochloride
TAC	total antioxidant capacity
TD	typical development

VPA sodium valproate
XO xanthine oxidase

緒 論

Autism spectrum disorder (ASD) とは、米国精神医学会が編集する Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 第5版(DSM-5)¹⁾における神経発達症群に分類される診断名の一つで、様々な状態を連続体(スペクトラム)として包含する診断名である。かつての Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 第4版(DSM-4)²⁾で広汎性発達障害に含まれていた、自閉性障害、アスペルガー症候群、レット障害、小児期崩壊性障害、特定不能の広汎性発達障害の各障害は、DSM-5において ASD 単一の診断名に再定義された。診断基準は「社会的コミュニケーションの障害」と「限定された興味」の2つの中核症状を満たすと DSM-5 では定められているが¹⁾、客観的・生物学的な検査判定基準はない。

ASD の罹患率は1%を超え^{3,4)}、男性の罹患率は女性よりも約4倍高いとされる⁵⁾。また、同胞の罹患率は約6%、一卵性双胎での一致率は約90%であり^{6,7)}、染色体微細構造異常などの遺伝的要因の関与が指摘されており、原因遺伝子の同定などの研究が広く進められている^{8,9)}。

一方、ASD の病因には遺伝的要因のほかに酸化ストレスとの関連が示唆されているが¹⁰⁾、遺伝子レベルの研究に比べ報告数は少なく、十分に研究が進んでいないのが現状である。また、ASD に関与するバイオマーカーの探索も望まれているが、広く臨床で応用されているバイオマーカーもない。

そのため、本研究では酸化ストレスマーカーを用い、ASD の酸化ストレス評価及び臨床応用への検討を行うこととした。

神経発達障害では、酸化ストレスとの関連が報告されており^{11,12)}、酸化ストレスマーカーに関する研究もいくつか見受けられる^{12,13,14)}。しかしこれらのマーカーは、特殊な機器が必要なため、臨床で即時に測定できるものではなく、かつ、生体内での総合的なストレスを評価できるものではない。また、ヒトは内因性の抗酸化能を有しているため¹⁵⁾、酸化ストレスは酸化値と抗酸化値の両面から総合的に評価されるべきである。

一方、現在酸化ストレスマーカーとして頻用される 8-OHdG(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)は、尿を試料とするため非侵襲的に生体内での酸化ストレスを評価できる長所を持つ¹⁵⁾。しかし、日中の活動状況や採取時刻により値が変動するため、誤差要因を減らすには 24 時間畜尿が必要であり¹⁶⁾、抗酸化能の評価はできない。

今回対象者には小児を含むため、試料採取や結果の精度には注意が必要であり、24 時間畜尿は身体的に困難であると考えた。

そこで本研究では、迅速で効率よく測定ができ¹⁷⁾、様々な疾患の評価指標に用いられている^{18,19,20)}、末梢血で測定が可能な酸化ストレスマーカーの Reactive oxygen metabolites (d-ROMs)と Biological antioxidant potential (BAP)に着目した。d-ROMs、BAP による酸化ストレス評価法は、同一検体・同一機器で酸化値と抗酸化値を測定・評価することが可能である。また迅速かつ簡便な手技で安定した酸化ストレス評価が可能であり、臨床で利用しやすい。

本研究の目的は、酸化ストレスマーカーの d-ROMs、BAP が ASD の診断・治療評価等で臨床に応用できるかを検討することである。

第一章では、これまで報告がなかった定型発達 (Typical development: TD)児の d-

ROMs・BAP 値を測定し、成長・発達による変化及び年齢による基準値を検討し、疾患を有する小児と年齢別の直接比較を可能にした。第二章では、第一章で得られた各年齢群における TD 児の d-ROMs・BAP 値を用いて、未治療 ASD 児と比較した。また、主観的評価と d-ROMs・BAP 値との関連性を検討し、d-ROMs・BAP 値が未治療 ASD 児の酸化ストレス評価における客観的指標になりうるかを検討した。第三章では、ASD 児における薬物治療介入前後の d-ROMs と BAP 値に着目し、d-ROMs と BAP が ASD 児の薬物治療評価の客観的指標になりうるかを検討した。

第一章 定型発達児における酸化ストレスマーカー d-ROMs・BAP 値の評価

本章の内容に関しては、*Journal of the Chinese Medical Association*

2019 Aug;82(8):651-654 に発表済みである。

第一節 序説

酸化ストレスとは、生体内の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、前者に傾き、生体にとって好ましくない状態と定義されている²¹⁾。酸化ストレスは、喫煙・血液透析・関節リウマチ・種々の精神疾患などで有意に高いという報告があり、細胞を傷つける多くの疾患に関与している²²⁾。

糖や脂肪などの栄養素は、体の中で分解され、細胞の中にあるミトコンドリアで酸化的リン酸化反応によってエネルギーに変換される。この過程で酸素分子の一部が反応性の高い活性酸素種となる。活性酸素種の一部は、免疫細胞による生体防御にも利用されるが、過剰に発生した活性酸素種は、酸化ストレスを亢進させ、DNA、脂質、タンパク質といった生体成分を酸化させる。酸化された DNA、脂質、タンパク質の中には、血液中や尿中に出てくるものがあり、それらは酸化ストレスマーカーとして生体内の酸化ストレスを知る手がかりとなる。特に、DNA 酸化で発生する 8-OHdG は

尿を使って非侵襲的に測定できるバイオマーカーとして広く用いられている¹⁸⁾。しかし、8-OHdG は日中の活動状況や採取時刻によって値が変動するため、誤差要因を減らすために 24 時間畜尿が必要となる¹⁶⁾。本研究の対象は、小児であり畜尿は身体的に困難である。さらに 8-OHdG は抗酸化値を測定・評価することはできない。

一方、d-ROMs、BAP による酸化ストレス評価法は、同一検体・同一機器で酸化値と抗酸化値を測定・評価することが可能であり、簡便な手技で安定した評価が可能であるため臨床で利用しやすい。

現在、d-ROMs と BAP は健康な成人における基準値が報告されている²³⁾。さらに、8-OHdG は、健康な小児における実測値の報告がある^{24,25)}。しかしながら、d-ROMs と BAP には TD 児における実測値の報告がないため、小児での年齢別の比較ができないことが問題である。そこで、TD 児における d-ROMs 値と BAP 値を測定し、成長・発達による変化及び年齢による基準値を明らかにするため、本研究を実施した。

第二節 方法

1.対象者

対象は、2017年5月から8月までの期間に、本人と親の同意を得ることができた2歳から15歳までの日本人77人（男39人、女38人）である。さらに、参考群として23歳から35歳までの健康成人7人（男3人、女4人）も対象とした。

採血適合基準は、本人や親からの問診と徳島赤十字ひのみね総合療育センター小児科医による診察で心身ともに健康と判断されたものとし、無作為に抽出された。

除外基準は、①基礎疾患がある、②現在何らかの疾患に罹患している、③治療または予防的に薬を投与している、④過去1ヶ月以内に何らかの疾患に罹患した、ものとした。

2.測定項目

(1)酸化ストレスの指標（d-ROMs test）

酸化ストレス評価は、体内で生成される過剰なフリーラジカルのレベルを正確に測定する必要がある。しかし、フリーラジカルは寿命が短く反応性が高いため、生体内での測定が困難である。d-ROMs test は、生体内のフリーラジカルや活性酸素によって生じた hydroperoxide を呈色反応で測定し、生体内の酸化ストレスの程度を総合的に評価する方法である。Hydroperoxide は、DNA、脂質、タンパク質などが酸化されることで産生される化学物質であり、比較的安定している。そのため血中 hydroperoxide 量を体内のフリーラジカル量と定義することができる。また、hydroperoxide は金属イ

オンが存在する条件下ではフリーラジカルを産生するため、hydroperoxide は酸化的損傷のマーカーであるだけでなく、さらにフリーラジカルを産生する組織損傷の増幅因子としてもみなすことができる。

健康な成人の被験者の血清サンプルでの結果では、d-ROMs 値は正規分布に似た分布をしていることが示され、この結果をもとに、d-ROMs 値の正常集団における規準範囲が設定されている。この値の単位は U.CARR が用いられ、正常範囲は、200~300 U.CARR となっている。1U.CARR は 0.08mg/dL の H₂O₂ に相当する。これは、血清の 300U.CARR の場合に、実際に過酸化水素 0.24 mg/dL が血液内に含まれていることを示すものではなく、血中の hydroperoxide 全部を過酸化水素に置き換えた場合を示している。また、d-ROMs test の結果からは Table1 のように異なる程度の酸化ストレスの度合いを表すことが示されている。

Table.1 Comprehensive evaluation of oxidative stress by the level of d-ROMs test

d-ROMs level		Oxidative stress
(U.CARR)	(mg H ₂ O ₂ /dL)	(Severity)
300-320	24.08-25.60	Border line condition
321-340	25.68-27.20	Slight oxidative stress
341-400	27.28-32.00	Moderate oxidative stress
401-500	32.08-40.00	Strong oxidative stress
>500	>40.00	Very oxidative stress
Normal range: 200-300 U.CARR (1 U.CARR is equivalent to 0.08 mg H ₂ O ₂ /dL)		

(Yasuhiro S. 生物試料分析 2009;Vol.32,No4)

これら d-ROMs test の結果はいずれも成人の血清サンプルのものであり、TD 児に関するデータの報告はない。また、Alberti らの研究では、d-ROMs test の妥当性を調査し、d-ROMs test 測定値と電子スピン共鳴 (ESR) 測定値との間に相関関係があるこ

とを報告している²⁶⁾。

(2)抗酸化力の指標 (BAP test)

BAP test は、抗酸化物質が活性酸素やフリーラジカルに電子を与え酸化反応を止める還元能力を測定し、抗酸化力を評価するものである。過酸化連鎖反応を止める力として、三価鉄から二価鉄への還元力を測定する。三価鉄から二価鉄への還元力が高いほど、生体内フリーラジカル除去能が高いことより、血液が持つ還元力を抗酸化力と定義することができる。単位は $\mu\text{mol/L}$ が用いられる。Benedetti らは、健康な人の BAP test の最適値は少なくとも 2,200Eq/L は必要であると報告している²⁷⁾。また、BAP 値からは Table2 のように抗酸化力の低下度が示されている。

Table 2 BAP test results and antioxidant barrier impairment.

BAP test results (Eq/L)	Impairment degree of plasma antioxidant barrier (Severity)
2,200-2,000	Border line condition
2,000-1,800	Slight reduction
1,800-1,600	Moderate reduction
1,600-1,400	Strong reduction
>1,400	Very strong reduction
Optimal value > 2.200 Eq/L	

(Eugenio Luigi Iorio. The BAP test and the global assessment of oxidative stress in clinical practice 2010)

ただし、これら BAP test の結果はいずれも成人の血清サンプルのものであり、TD 児に関するデータの報告はない。d-ROMs test と BAP test を組み合わせて実施することで、酸化と還元の両方を評価したさまざまな研究（糖尿病、非アルコール性脂肪性

肝炎、てんかん、頸動脈硬化症等）が報告されている^{28, 29, 30, 31}。

(3)抗酸化能 (BAP/d-ROMs ratio)

d-ROMs test と BAP test の測定で得られた値を用い、BAP 値/d-ROMs 値の比を算出した。そして、抗酸化力/酸化度で算出された比を酸化ストレスと抗酸化力の平衡・バランスを示す「抗酸化能」と定義した。

(4)CRP (C-reactive protein)

CRP は組織崩壊が起きると、肝臓へと産生刺激が伝わり増加する蛋白質であり、代表的な炎症マーカーとされる。血清中の CRP を定量することで炎症反応の指標とすることができる。CRP は d-ROMs 値と相関するとの報告がある^{32, 33}。そこで d-ROMs 値の増加が炎症反応によるものである可能性を除外するため CRP を測定した。

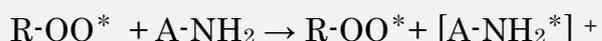
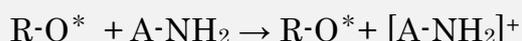
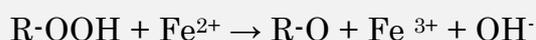
3.測定原理

(1)d-ROMs test

d-ROMs test は試験管内での現象を生体内で起こる現象として再現することに基づいている。血液を pH4.8 の酸性緩衝液で希釈すると、トランスフェリンから鉄イオンが放出される。鉄イオン存在下で、フェントン反応により血清中の hydroperoxide (ROOH) が分解され、フリーラジカル (R-O \cdot : alkoxy radical、R-OO \cdot : peroxy radical) を産生する。さらに無色の呈色液クロモゲン (N,N-diethyl-paraphenylenediamine) を加えると、反応性が非常に高いフリーラジカル (R-O \cdot と R-OO \cdot) が新たに産生され、

芳香族アミンの呈色液から電子を引き抜くことで、無色の呈色液は有色のラジカル陽イオンを形成する。このラジカル陽イオンは比較的安定しているため、発色を利用して光度計で測定することが可能である。もともとは無色であるクロモゲンが、電子を放出することでピンク色へと変化する。その発色の強度が血清中に存在していた hydroperoxide の濃度に比例するため、そのピンク色の濃度を光度計がついた専用機器により測定する。

Figure.1 The reactions of d-ROMs test



-R-OOH : generic hydroperoxide -R-O* : alkoxy radical of a generic hydroperoxide

-R-OO* : hydroperoxy radical of a generic hydroperoxide

-A-NH₂ : N,N-diethyl-paraphenylenediamine (chromogen)

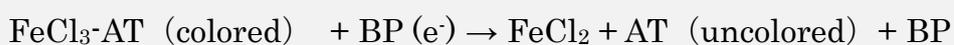
-[A-NH₂*]⁺ : coloured radical cation of the chromogen

(3)BAP test

BAP test は特別な発色基質に結合した第二鉄 (Fe³⁺) イオンを含む着色溶液に還元を追加することで Fe³⁺ が第一鉄イオン (Fe²⁺) に還元させる時に脱色する能力に基づいている。まず初めに、三価鉄塩と無色のチオシアン酸塩を反応させ、Fe³⁺として赤く呈色をさせる。そこに試料を添加し、試料中の抗酸化物質の作用で Fe²⁺に還元され

着色溶液の赤色が脱色する。その色の変化を光度計で計測することにより、還元された第二鉄イオンの量を評価し、還元力を抗酸化力として評価する。

Figure.2 The reactions of BAP test



AT (uncolored) : thiocyanate derivative (uncolored) FeCl₃: ferric chloride

FeCl₃-AT (colored) : colored complex of ferric chloride with the thiocyanate derivative

BP (e⁻): molecule of blood plasma barrier with reducing/electron giving/antioxidant activity against ferric ions

BP: the oxidized form of BP(e⁻)

FeCl₂: the ferrous chloride obtained by the reducing activity of BP (e⁻)

4.測定方法

2017年5月から8月までの期間の10時から17時の間に採血を行い、サンプルを採取した。血液検体は直ぐに3000rpmで10分間遠心分離し、得られた血漿を測定まで-30℃のフリーザーで保存した。CRPは、冷凍保存せず採血後直ちに免疫反応測定装置「Celltac Chemi CRP3100」(Nihon Koden, Tokyo, Japan)を用いて測定した。

(1)d-ROMs test

各血清サンプル(20μL)を、インキュベーターで少なくとも15分間温めたpH 4.8

buffer で満たしたキュベットに入れる。次に、キュベットを静かに転倒攪拌し、血液タンパク質から Fe^{2+} および Fe^{3+} を分離させる。 Fe^{2+} および Fe^{3+} は触媒として作用し、血液中 hydroperoxide が alkoxy radical と peroxy radical に分解される。次に、N,N-diethyl-paraphenylenediamine (20 μL) を発色色素としてキュベットに入れ、キュベットを再度緩やかに転倒攪拌し、フリーラジカル解析装置「FREE CARRIO DUO」(Diacron International, Grosseto, Italy) の測定セルにキュベットを挿入し測定を行う。およそ 5 分経過すると結果が表示される。

(2)BAP test

特殊な有色基質で満たしたキュベットをインキュベーターで少なくとも 15 分間温める。 Fe^{3+} を含む発色試薬 50 μL をキュベットに添加し、緩やかに転倒攪拌し、フリーラジカル解析装置の測定セルに挿入する。3 秒後、各血清サンプル (10 μL) キュベットに添加し、緩やかに転倒攪拌し、再度測定セルに挿入する。およそ 5 分経過すると結果が表示される。フリーラジカル解析装置は d-ROMs test と同じく「FREE CARRIO DUO」(Diacron International, Grosseto, Italy) を用いた。

5.統計学的検討

年齢と d-ROMs 値、BAP 値及び BAP/d-ROMs 比の関係について、相関係数 r と P 値を算出した。また、d-ROMs 値、BAP 値及び BAP/d-ROMs 比について 2-6 歳を A 群、7-11 歳を B 群、12-15 歳を C 群、健康成人を D 群と分類し、Kruskal-Wallis test で 4 群間を比較した。各測定値と年齢群間の性差は、Mann-Whitney U test で比較した。

統計解析ソフトは IBM SPSS Statistics version21 を使用した。

6.倫理的配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づき、徳島赤十字ひのみね総合療育センター倫理委員会の承認を得て実施した。対象患者の選定にあたり、本人と家族に文書にて説明し、書面で可能な限り本人の同意を得た。また、希望しない場合はいつでも拒否できること、それにより何ら不利益を被ることがないことを説明した。測定より得られたデータは個人が特定できないように匿名化した。

第三節 対象者背景

Table 3,4 に対象者背景の詳細を示す。小児対象者の「年齢」は 8.49 ± 3.75 歳(mean \pm SD)、中央値は 8 歳、最高齢は 15 歳、最小齢は 2 歳であった。「性別」は男性 50.6%、女性 49.4%であった。

年齢群別の「性別」は、A 群 (2-6 歳) は男性 15 人、女性 13 人、B 群 (7-11 歳) は男性 15 人、女性 13 人、C 群 (12-15 歳) は男性 9 人、女性 12 人。参照群として、D 群 (23-35 歳) は男性 3 人と女性 4 人であった。

全対象者の CRP 値は 0.08 ± 0.05 mg/dL (mean \pm SD) であり、全対象者において CRP の上限値 0.3mg/dL を超えるものはなかった。

Table 3 Background of children ($n = 77$) subjects.

Age (y)	Means \pm SD	8.49 ± 3.75
	Median	8
	Maximum	15
	Minimum	2
Sex (n)	Male	39
	Female	38

SD=Standard deviation y=years

Table 4 Background of children ($n = 77$) and adults ($n = 7$) subjects.

Gender comparison by age group (n)		
Group A (2-6 years)	Male	15
	Female	13
Group B (7-11 years)	Male	15
	Female	13
Group C (12-15 years)	Male	9
	Female	12
Group D (23-35 years)	Male	3
	Female	4
Blood test result (children and adults)		
CRP (mg/dL)	Means \pm SD	0.08 \pm 0.05

SD=Standard deviation

第四節 年齢群別における各測定値の性差

Table 5 に年齢群別における各測定値間の性差を示す。同じ年齢群では、いずれの測定値にも有意な性差は認められなかった。

Table 5 Comparison of gender differences among each measured value and age groups.

	Age groups	Sex	Mean \pm SD	P value
d-ROMs level	Group A (2-6 years)	Male	401.4 \pm 57.1	0.751
		Female	409.5 \pm 63.6	
	Group B (7-11 years)	Male	308.3 \pm 57.1	0.453
		Female	300.5 \pm 28.9	
	Group C (12-15 years)	Male	277.7 \pm 18.8	0.362
		Female	285.5 \pm 23.1	
	Group D (23-35 years)	Male	287.0 \pm 29.2	0.561
		Female	297.0 \pm 8.5	
BAP level	Group A (2-6 years)	Male	2131.7 \pm 322.1	0.113
		Female	2293.5 \pm 232.1	
	Group B (7-11 years)	Male	2443.4 \pm 350.9	0.345
		Female	2331.8 \pm 166.1	
	Group C (12-15 years)	Male	2320.0 \pm 179.6	0.771
		Female	2314.4 \pm 239.8	
	Group D (23-35 years)	Male	2402.1 \pm 186.2	0.568
		Female	2473.3 \pm 212.5	

	Age groups	Sex	Mean \pm SD	P value
BAP/d-ROMs ratio	Group A (2-6 years)	Male	5.45 \pm 1.30	0.667
		Female	5.71 \pm 0.96	
	Group B (7-11 years)	Male	7.95 \pm 1.18	0.942
		Female	7.82 \pm 0.91	
	Group C (12-15 years)	Male	8.38 \pm 0.81	0.722
		Female	8.14 \pm 0.96	
	Group D (23-35 years)	Male	8.45 \pm 1.24	0.683
		Female	8.32 \pm 0.60	

SD=Standard deviation

第五節 各測定値と年齢の関係

Figure 3A に d-ROMs 値における年齢群間の比較を示す。A 群 (2-6 歳) は、B 群 (7-11 歳) と C 群 (12-15 歳)、D 群 (健康成人) のそれぞれの群と比較し有意に d-ROMs 値が高かった(A vs. B: $p < 0.001$, A vs. C: $p < 0.001$, A vs. D: $p < 0.001$)。 B 群と C 群・D 群の間、C 群と D 群の間に有意な差は認められなかった。次に Figure 3B に年齢と d-ROMs 値の相関関係を示す。年齢が低いほど d-ROMs 値は高く、年齢が高くなるにつれて d-ROMs 値は低下する有意な相関関係が認められた($r = -0.809$, $p < 0.001$)。

Figure 4A に BAP 値における年齢群間の比較を示す。全ての群間において有意な差は認められなかった。次に Figure 4B に年齢と BAP 値の相関関係を示す。年齢と BAP 値に有意な相関関係は認められなかった ($r = -0.189$, $p = 0.105$)。

Figure 5A に BAP/d-ROMs 比における年齢群間の比較を示す。A 群は、B 群と C 群、D 群のそれぞれの群と比較し有意に BAP/d-ROMs 比が低かった(A vs. B: $p < 0.001$, A vs. C: $p < 0.001$, A vs. D: $p < 0.001$)。 次に Figure 5B に年齢と BAP/d-ROMs 比の相関関係を示す。年齢が低いほど BAP/d-ROMs 比は低く、年齢が高くなるにつれて BAP/d-ROMs 比は上昇し、有意な相関関係が認められた($r = 0.743$, $p < 0.001$)。

Figure.3A Comparison between each age groups and d-ROMs values

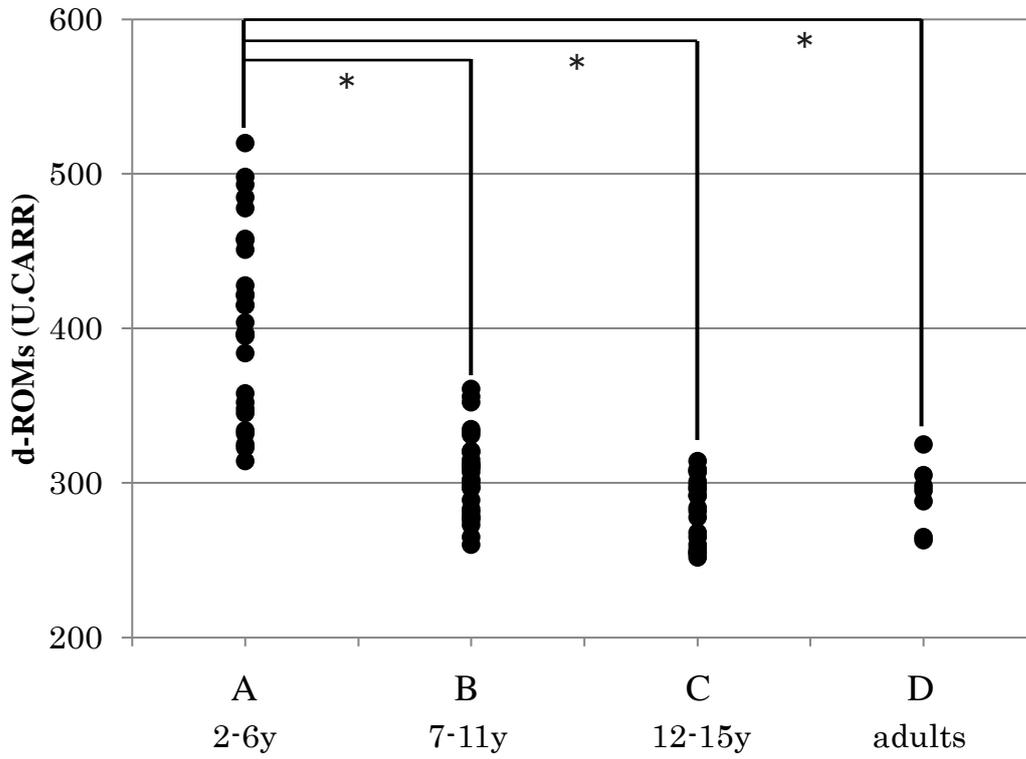


Figure.3B Relationship between d-ROMs values and age

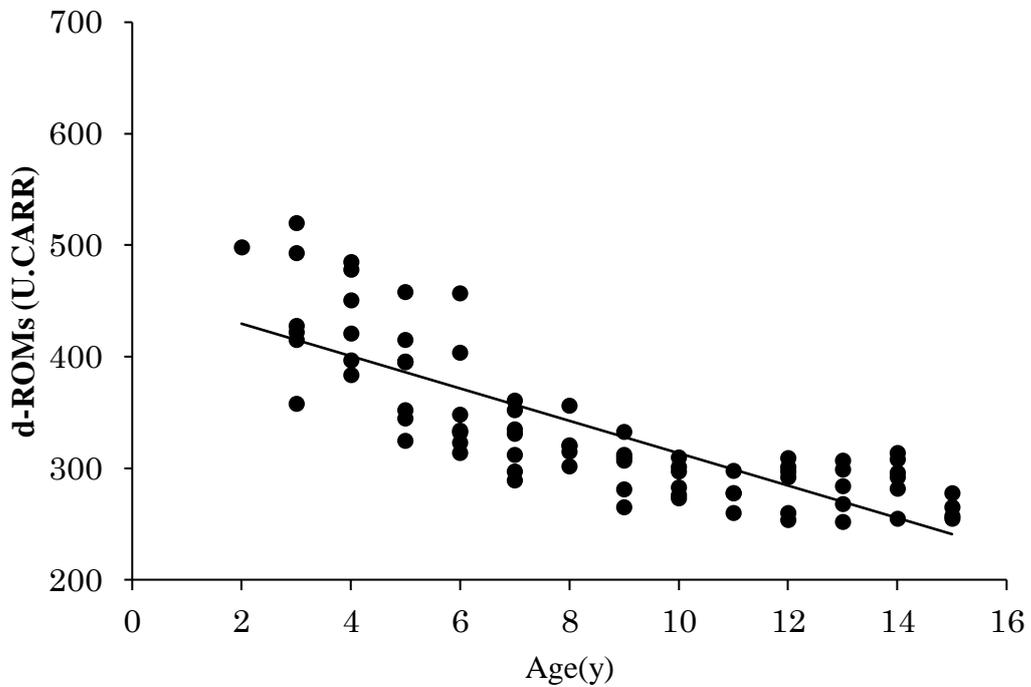


Figure.4A Comparison between each age groups and BAP values

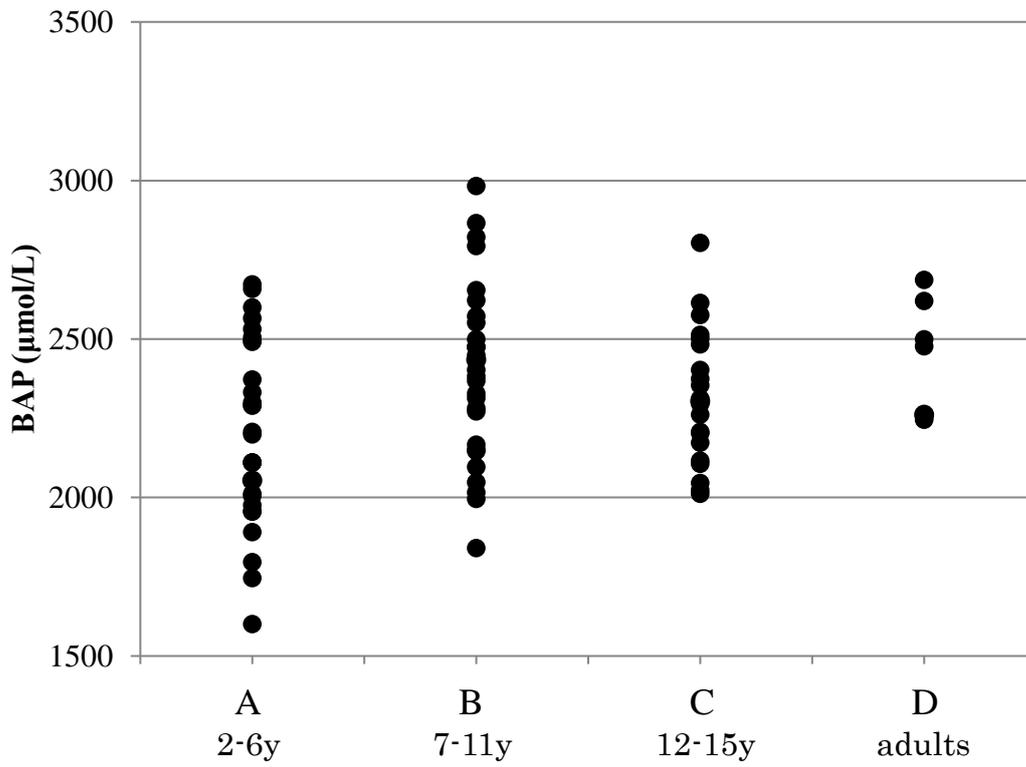


Figure.4B Relationship between BAP values and age

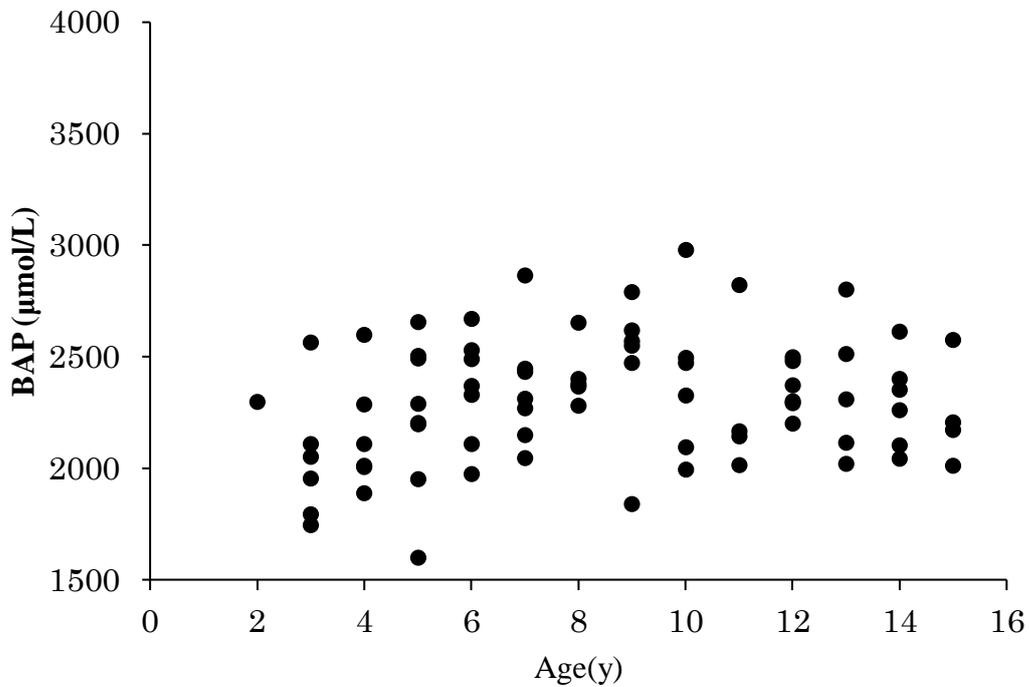


Figure.5A Comparison between each age groups and BAP/d-ROMs ratio

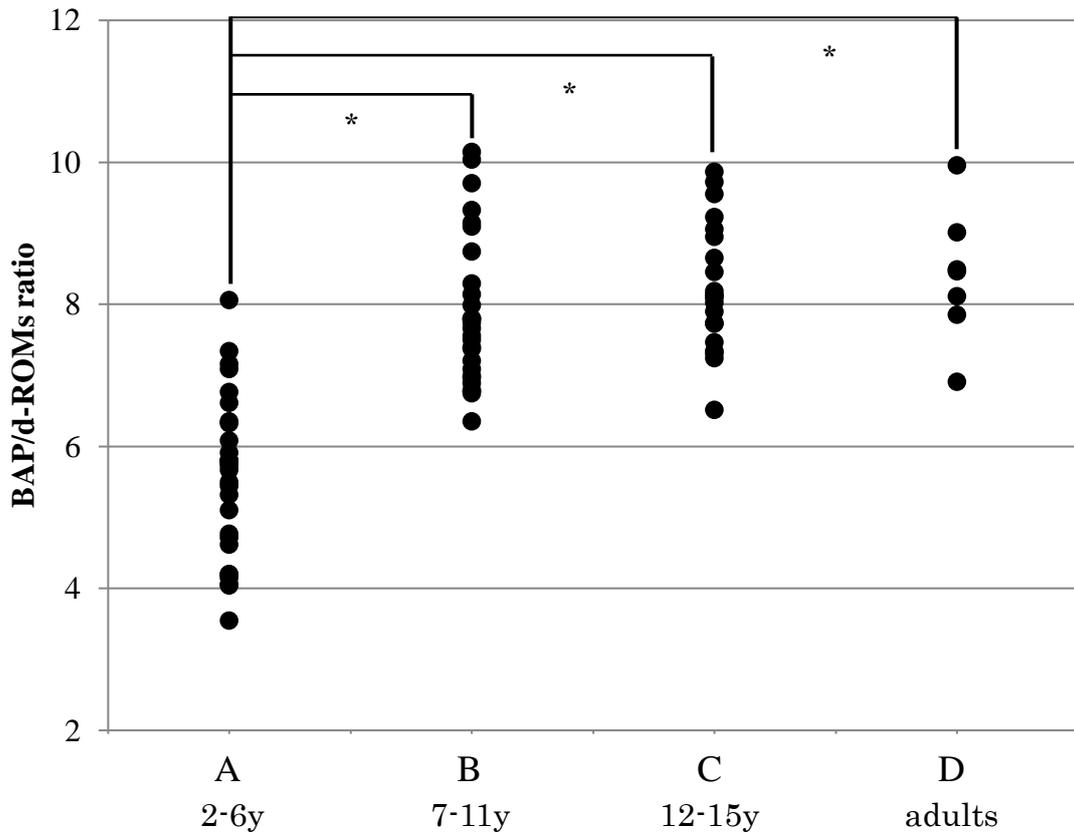
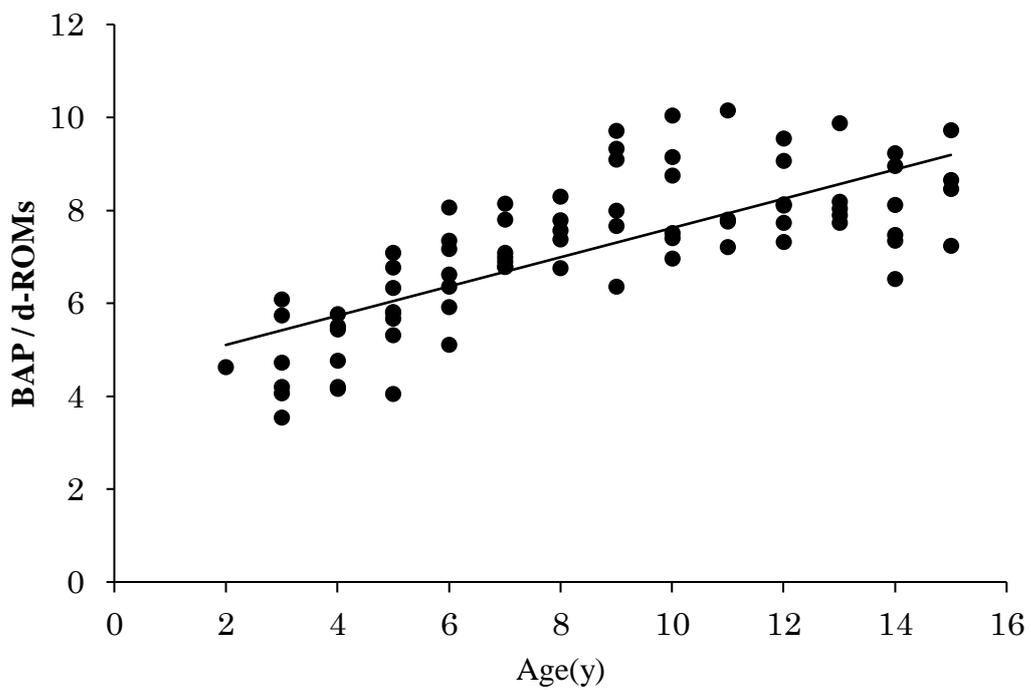


Figure.5B Relationship between BAP/d-ROMs ratio and age



第六節 小括

生体内のフリーラジカルは、半減期が非常に短く ESR で測定することはほぼ不可能である。一方 d-ROMs test は、peroxy radical や alkoxy radical の前駆物質である hydroperoxide を定量的に測定するため安定性が高い。また、微量の血液（血漿 20 μ L）で測定できるため指先穿刺で検体を採取することも可能である。さらに、測定時間も約 5 分と短く、侵襲性が低く短時間で判定可能である³⁴⁾。さらに Nojima らが報告しているように再現性が高い酸化ストレスマーカーである³⁵⁾。そのため近年、d-ROMs test は各種疾患のスクリーニングや治療評価に用いられるようになり、心血管疾患や腎不全、肺疾患、高血圧、アルツハイマー型認知症など多領域で応用されている^{36, 37, 38, 39, 40)}。また、疾患を有する小児を対象とした報告も散見されるが^{30, 41, 42)}、これまで、TD 児の d-ROMs・BAP 値の報告はなかった。本研究では、TD 児の d-ROMs・BAP 値を測定したところ「年齢」が d-ROMs 値に影響し、BAP 値には影響しなかった。Nojima らは、成人では加齢とともに d-ROMs 値は有意に増加し、BAP 値は年齢に関連しないと報告しており³⁵⁾、本研究結果と類似している。このことについて、小児においても、成長年齢に応じた比較が重要であることが示唆された。

他の酸化ストレスマーカーについて、Tamura らは 8-OHdG は TD 児において年齢が低いほど高く、年齢が高くなるにつれて低下すると報告している²⁵⁾。また、Tsukahara らは、8-OHdG の値は 10-12 歳で一定レベルに落ち着くと報告している⁴³⁾。これらの報告と本研究の d-ROMs 値の年齢による推移は近似しており、TD 児の d-ROMs と 8-OHdG の値は相関関係があると推察される。

尿検体を使用する 8-OHdG は、クレアチニン補正を行うため 24 時間蓄尿が最も高精度とされているが¹⁶⁾、小児は成人と異なりクレアチニン値にばらつきが生じることが指摘されている^{44, 45)}。そのため精度は劣るが排尿間隔 6 時間以上の早朝第一尿が推奨されている¹⁶⁾。このように尿 8-OHdG は低侵襲であるが、検体採取やその精度に注意が必要である。さらに、8-OHdG は日内変動や日差変動が報告されているが⁴⁶⁾、d-ROMs test は時間による変動がない³⁵⁾。そのうえ、高気圧酸素の暴露前後の d-ROMs と 8-OHdG の変化について評価した研究では、暴露後 d-ROMs は有意に上昇したことに対して、8-OHdG では有意な上昇が認められなかったとの報告があり⁴⁷⁾、鋭敏性でも d-ROMs test は有効な酸化ストレスの評価法であると考えられる。

対象者は、多くの除外基準を設け、医師の診察や d-ROMs と相関するとされる CRP を確認するなど健康な状態を保証した。しかしなぜ、低年齢ほど d-ROMs 値が増加するのか。d-ROMs 値は細胞やミトコンドリア、DNA 損傷により増加するとされている⁴⁸⁾。このことより低年齢であるほど生体内細胞の増殖は活発であり、代謝回転が速く細胞死と再生を繰り返しながら成長・発達が進む年齢期であることが関連しているのではないかと推測する。また、学童期（7-11 歳）と比較し幼児期（2-6 歳）は採血に対し不安や恐怖心は強く、これらによる心理的ストレスの影響が関与している可能性も否定できない。

本研究において、年齢が低いほど d-ROMs 値は高く、BAP/d-ROMs 比は低い傾向が示唆された。人には気温など外部環境の変化や、体温など内部環境の変化に対して、適応しようとする生体恒常性（ホメオスタシス）を有している⁴⁹⁾。d-ROMs や 8-OHdG など酸化値のみ高い場合、ホメオスタシスにより抗酸化力が活性化され、打ち消しあ

って平衡状態を保っているかもしれない。これらのことより、酸化値のみでも一定の指標にはなりうると思うが、酸化値と抗酸化値の比を用いることで、より正確な生体内酸化ストレス評価が可能になると思われる。さらに、酸化ストレス評価は酸化度・抗酸化度のどちらか一方のみで評価するのではなく、相反する2つの値を用いて評価することで真の酸化ストレス状態が明らかになるものとする。また、バイオマーカーを臨床で用いる場合、特に小児は年齢を考慮した判断が必要である。

本研究の限界として、対象としたTD児のサンプル数が少なく小児の正常値データとしては十分ではない。また、本研究の対象者はTD児であることを確定するため様々な除外基準を設けたが、それでも見つけられない影響因子が存在していたかもしれない。今後さらにサンプル数を増やし、TD児の年齢ごとの値を求め、臨床的信憑性を高めていく必要があると考える。

本研究結果より、TD児のd-ROMs・BAP値の傾向が明らかとなった。また、d-ROMs値と既存のマーカーである8-OHdGとの互換性も示唆された。さらにd-ROMs・BAPは、酸化度と抗酸化度の相反する値を測定・検討することにより、総合的な酸化ストレス評価が可能な酸化ストレスマーカーであることが示唆された。

そして、各年齢群におけるTD児のd-ROMs・BAP値が示されたことで、疾患を有する小児と年齢別の直接比較が可能となり、臨床現場において診断・評価の有用な客観的指標として応用できると考える。

第二章 Autism spectrum disorder における酸化ストレスマーカーd-ROMs・BAP 値の評価

本章の内容に関しては、PLoS One 2020 May 22;15(5) に発表済みである。

第一節 序説

Autism spectrum disorder (ASD) は、社会的コミュニケーション能力の欠如や限定された行動・興味を中核症状とする神経発達障害であり、その罹患率は増加傾向にある³⁾。ASD は心理的ストレスにより不眠、抑うつ、不安などの二次的な症状を合併することがあり^{50,51)}、攻撃的行動や自傷・異食・自殺企図の割合が高くなる⁵²⁾。さらに、成人期の貧困・自殺などに関連する場合があるとの報告もなされている⁵³⁾。

また、自己免疫異常、脳の炎症性変化、ミトコンドリア機能異常など ASD の脳障害に関連する要因が報告されており、これらの状態では酸化ストレスの亢進が想定される^{54,55,56)}。

現在の ASD の診断や評価は、DSM-5 で定められた基準で行われているが、客観的・生物学的な検査判定基準はない。そのため近年、様々なバイオマーカーの探索がなされている⁵⁷⁾。中でも、神経発達障害と酸化ストレスとの関連が示唆されており^{11,12)}、

nitric oxide synthase (NOS), xanthine oxidase (XO), glutathione S-transferase (GST), paraoxonase-1 (PON-1), glutathione, methionine, cysteine などの酸化ストレスマーカーが報告されている^{12,13,14)}。他の疾患と同様、ASD の診断、治療評価などにおいても迅速かつ簡便であることは患者にとっても有益であるが、これらマーカーは、臨床で即時に測定できるものではない。本研究で用いた d-ROMs と BAP は、迅速かつ簡便に測定が可能な酸化ストレスマーカーである¹⁷⁾。

ASD と d-ROMs の関係についての報告は現在ない。ただし、d-ROMs test は血清 hydroperoxide が鉄イオンとのフェントン反応により alkoxyl radical と peroxy radical を生成し、それらを定量的に測定する方法である。ASD による酸化ストレス評価とフェントン反応との関係については報告があり^{58,59)}、d-ROMs は酸化ストレス評価にも適用できる可能性がある。

一方、BAP test は過酸化連鎖反応を止める力として、三価鉄から二価鉄へ還元する能力を測定する方法である。ASD における炎症マーカーと血清鉄の減少との関係を調査した報告があり、BAP も ASD の酸化ストレスの評価に適用できる可能性がある⁶⁰⁾。

本研究の目的は、d-ROMs と BAP が、未治療 ASD 児のストレス評価における客観的指標になりうるか、検討することである。

第二節 方法

1.対象者

対象者は、2歳から15歳の日本人で、TD児77人（男39人、女38人）、未治療のASD児98人（男73人、女25人）である。

TD児の適合基準は、小児科専門医による診察で、心身ともに健康と判断されたものとした。

除外基準は、①基礎疾患がある、②治療または予防的に薬を投与している、③過去1ヶ月以内に何らかの疾患に罹患した、ものとした。

ASD児の適合基準は、小児神経専門医による診察で、DSM-5に基づいた評価と臨床症状より、ASDと診断された未治療の患者とした。

除外基準は、①発達障害以外の基礎疾患がある、②ASDに対して治療介入している、③何らかの薬剤を使用している、ものとした。なお、2歳のASD児については追跡し、3歳で再びASDと確認された。

第一章の結果では小児において低年齢ほどd-ROMs値が高かった。また、就学前と就学後の環境の変化により、子供のストレスレベルが異なるとの報告がある⁶¹⁾。そのため、年齢と生活環境がストレスに影響する可能性を考慮し、TD児とASD児ともに幼児（2-6歳）と就学児（7-15歳）の2群に分類した。

2.測定項目

(1)酸化ストレスの指標（d-ROMs test）

d-ROMs test は血清中の hydroperoxide の量を測定することで体内の酸化ストレスを評価する。

(2)抗酸化力の指標 (BAP test)

BAP test は三価鉄から二価鉄への還元力を測定することで、生体内のフリーラジカル除去能である抗酸化力を評価する。

(3)抗酸化能 (BAP/d-ROMs ratio)

d-ROMs test と BAP test の測定で得られた値を用い、BAP 値/d-ROMs 値の比を算出した。そして、抗酸化力/酸化度で算出された比を「抗酸化能」と定義した。

3.測定方法

2016年12月から2018年9月の期間に、対象者の採血を行った。血液検体は1469Gで10分間遠心分離し、血漿を試料とした。d-ROMs、BAPの測定はフリーラジカル解析装置「FREE CARRIO DUO」(Diacron International, Grosseto, Italy)を用いて測定した。

4.その他検討項目

対象者の Parent-interview ASD Rating Scales-Text. Revision (PARS-TR) スコアを調査した。PARS-TR は ASD の発達・行動症状について母親(母親から情報が得がたい場合は他の主養育者)に面接し、その存否と程度を評定する評価尺度である。評価

項目は対人、コミュニケーション、こだわり、帯同行動、困難性、過敏性の6領域57項目から成る。各項目の程度を3段階(0、1、2)で評価し、合計したスコアが高ければASDを疑う。

また、知的機能がこの研究の結果に影響したかどうかを判断するために、ASD児群は知能テストを実施してIQ (Intelligence Quotient) を調査した。IQ < 70は知的障害として定義され、知的障害がd-ROMs、BAPおよびBAP / d-ROMs比に影響を与えるかについて分析した。

5. 統計学的検討

性別と各検査値の関係について、Mann-Whitney U test で解析した。対象者を、A群(2-6歳 TD児)、B群(2-6歳 ASD児)、C群(7-15歳 TD児)、D群(7-15歳 ASD児)に分類し、各年齢群と各検査値の関係について、Kruskal-Wallis test で解析した。

PARS-TRスコアとd-ROMs値及びBAP値との関係について、相関係数rとP値を算出し、各年齢群で比較した。知的機能とd-ROMs値、BAP値及びBAP / d-ROMs比の関係は、Mann-Whitney U test で解析した。統計解析ソフトはIBM SPSS Statistics version21を使用した。

6. 倫理的配慮

本研究は徳島赤十字ひのみね総合療育センター倫理委員会の承認を得て実施した。対象者本人と家族に文書で説明し、書面で可能な限り本人の同意を得た。また、希望しない場合はいつでも拒否できること、それにより何ら不利益を被ることがないこと

を説明した。

第三節 対象者背景

Table1 に対象者の「背景」を示す。平均年齢は、ASD 児群では 7.08 ± 2.87 歳、TD 児群では 8.49 ± 3.75 歳でした。どちらも、最低年齢は 2 歳、最高年齢は 15 歳であった。男性の比率は、ASD 児群で 74.5% と高く、TD 児群では男性と女性の比率は 1 : 1 であった。カイ二乗分布で検定し、年齢は TD 児群と ASD 児群で有意な差は認められなかった。

Table 1 Background of TD children and ASD children subjects.

		TD children (<i>n</i> = 77)	ASD children (<i>n</i> = 98)
Age (y)	means \pm SD	8.49 \pm 3.75	7.08 \pm 2.87
	median	8	7
	maximum	15	15
	minimum	2	2
Sex	male	39 (50.6%)	73 (74.5%)
	female	38 (49.4%)	25 (25.5%)
Gender comparison by age group			
2 – 6 y (n)	male	15	37
	female	13	13
7 – 15 y (n)	male	24	36
	female	25	12

SD = Standard deviation; y = years.

第四節 各測定値と性差比較

Table 2 は各測定値と各年齢群間の性差比較を示す。TD 児群、ASD 児群ともに d-ROMs 値、BAP 値、BAP/d-ROMs 比、全てにおいて性別による有意な差は認められなかった。

Table 2 Comparison of gender differences among each measured value and age groups.

Age (y)	Sex ^a	TD children (n = 77)		ASD children (n = 98)	
		Mean ± SD	p	Mean ± SD	p
d-ROMs level					
2 - 6	M	401.4±57.1	0.75	427.0±53.3	0.79
	F	409.5±63.6		435.2±73.6	
7 - 15	M	296.7±27.8	0.78	421.3±69.5	0.41
	F	293.3±26.8		410.9±49.9	
BAP level					
2 - 6	M	2131.7±322.1	0.11	2751.7±494.4	0.24
	F	2293.5±232.1		2606.9±379.7	
7 - 15	M	2397.1±299.9	0.41	2555.1±380.1	0.94
	F	2323.4±200.6		2561.1±426.9	
BAP/d-ROMs ratio					
2 - 6	M	5.45±1.30	0.66	6.40±1.15	0.53
	F	5.71±0.96		6.58±0.83	
7 - 15	M	8.11±1.06	0.77	6.23±1.18	0.43
	F	7.97±0.93		6.59±1.34	

SD = standard deviation; y = years; ^aSex M = male, F = female.

第五節 知的機能と各測定値との関係

Table 3 に、ASD 児の知的機能と測定値（d-ROMs 値、BAP 値、BAP / d-ROMs 比）の関係を示す。知的障害のない群($IQ \geq 70$)と知的障害のある($IQ < 70$)を比較すると、いずれの測定値も有意差は認められなかった。

Table 3 Relationship between intelligent function and d-ROMs, BAP and BAP/d-ROMs

	IQ \geq 70 (n = 85) mean \pm SD	IQ < 70 (n = 13) mean \pm SD	p
d-ROMs level	422.2 \pm 66.8	426.5 \pm 66.5	0.821
BAP level	2627.6 \pm 436.2	2698.0 \pm 408.4	0.987
BAP/d-ROMs ratio	6.316 \pm 1.162	6.405 \pm 0.960	0.749

IQ = intelligence quotient, SD = standard deviation

第六節 各年齢群における TD 児と ASD 児との 各測定値の比較

Figure1A に TD 児と ASD 児の各年齢群と d-ROMs 値の関係を示す。TD 児では、A 群(2-6 歳 TD 児)は、C 群(7-15 歳 TD 児)より d-ROMs 値が有意に高かった($p < 0.001$)。

ASD 児では、D 群 (7-15 歳 ASD 児) は、C 群 (7-15 歳 TD 児) より d-ROMs 値が有意に高かった。 ($p < 0.001$) ただし、A 群 (2-6 歳 TD 児) と B 群 (2-6 歳 ASD 児) ($p = 0.072$) の間、及び B 群 (2-6 歳 ASD 児) と D 群 (7-15 歳 ASD 児) ($p = 0.210$) の間では、有意差は認められなかった。

Figure1B に TD 児と ASD 児の各年齢群と BAP 値の関係を示す。TD 児と ASD 児の BAP 値には差が認められ、B 群 (2-6 歳 ASD 児) は A 群 (2-6 歳 TD 児) より BAP 値が有意に高かった($p < 0.001$)。また、D 群 (7-15 歳 ASD 児) は C 群 (7-15 歳 TD 児) より BAP 値が有意に高かった($p = 0.003$)。

Figure1C に TD 児と ASD 児の各年齢群と BAP / d-ROMs 比の関係を示す。C 群 (7-15 歳 TD 児) は A 群 (2-6 歳 TD 児) と D 群 (7-15 歳 ASD 児) より BAP / d-ROMs 比が有意に高かった。 ($p < 0.001$) ただし、A 群 (2-6 歳 TD 児) と B 群 (2-6 歳 ASD 児) ($p = 0.063$) の間、及び B 群 (2-6 歳 ASD 児) と D 群 (7-15 歳 ASD 児) ($p = 0.831$) の間では、有意差は認められなかった。

Figure. 1A Comparison of d-ROMs level and age group.

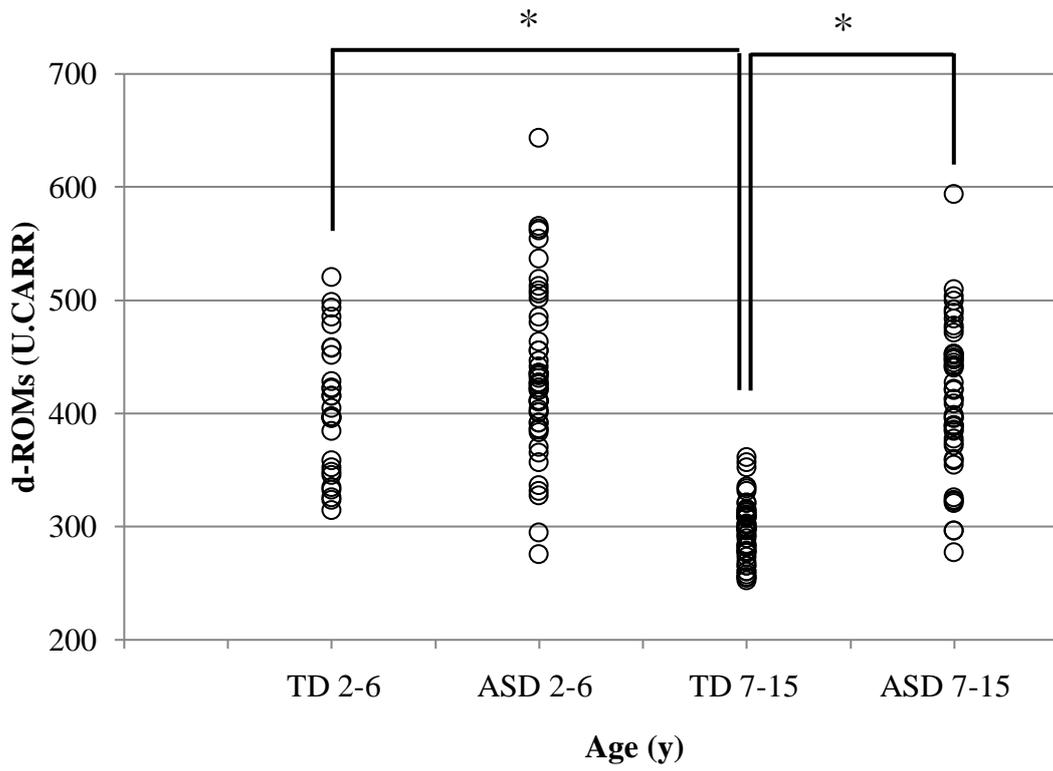


Figure. 1B Comparison of BAP level and age group.

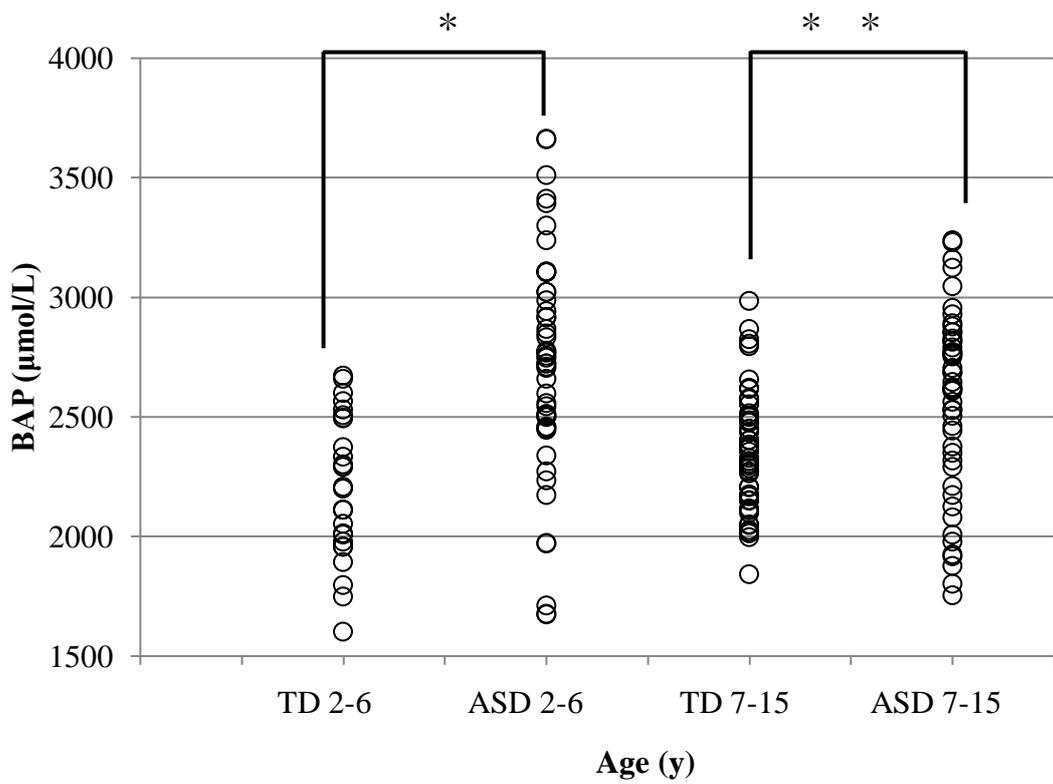
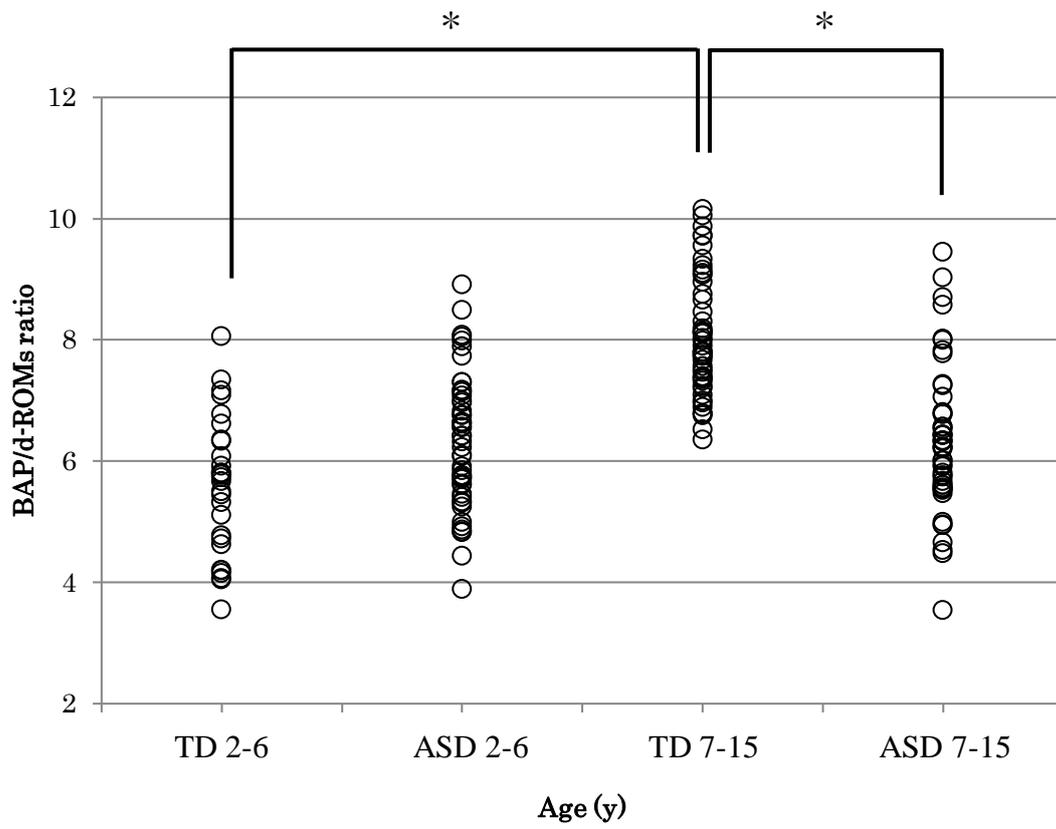


Figure. 1C Comparison of BAP/d-ROMs ratio and age group.



第七節 PARS-TR スコアと d-ROMs 値・BAP 値との関係

TD 児と ASD 児の PARS-TR スコアを比較すると、ASD 児のスコアが有意に高かった ($p < 0.001$)。

Figure2 に全対象者の PARS-TR スコアと d-ROMs 値の関係を示す。PARS-TR スコアが高くなるほど d-ROMs 値も上昇する、有意な相関が認められた(Figure2A: group aged 2-6 years $r = 0.343$, $p = 0.045$ Figure2B: group aged 7-15 years $r = 0.791$, $p < 0.001$)。

Fig 3 に全対象者の PARS-TR スコアと BAP 値の関係を示す。2-6 歳群及び 7-15 歳群ともに PARS-TR スコアと BAP 値には有意な相関は認められなかった(Figure3A: group aged 2-6 years $r = 0.211$, $p = 0.078$ Figure3B: group aged 7-15 years $r = 0.166$, $p = 0.107$)。

Figure 2A Relationship between PARS scores and d-ROMs levels in group aged 2-6 years.

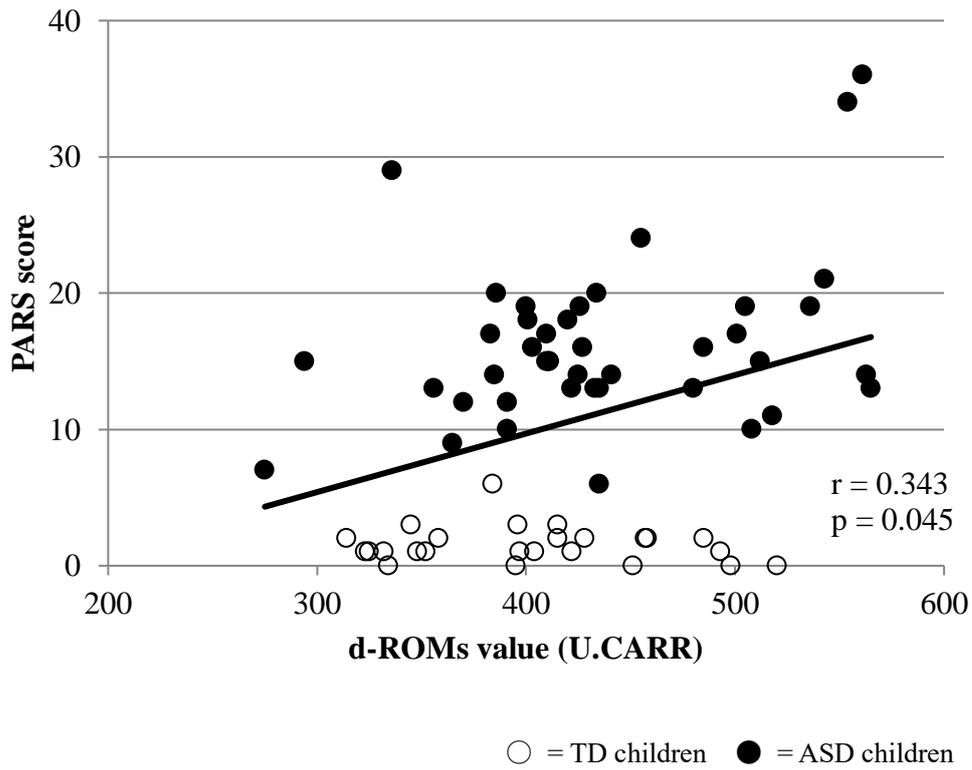


Figure 2B Relationship between PARS scores and d-ROMs levels in group aged 7-15 years.

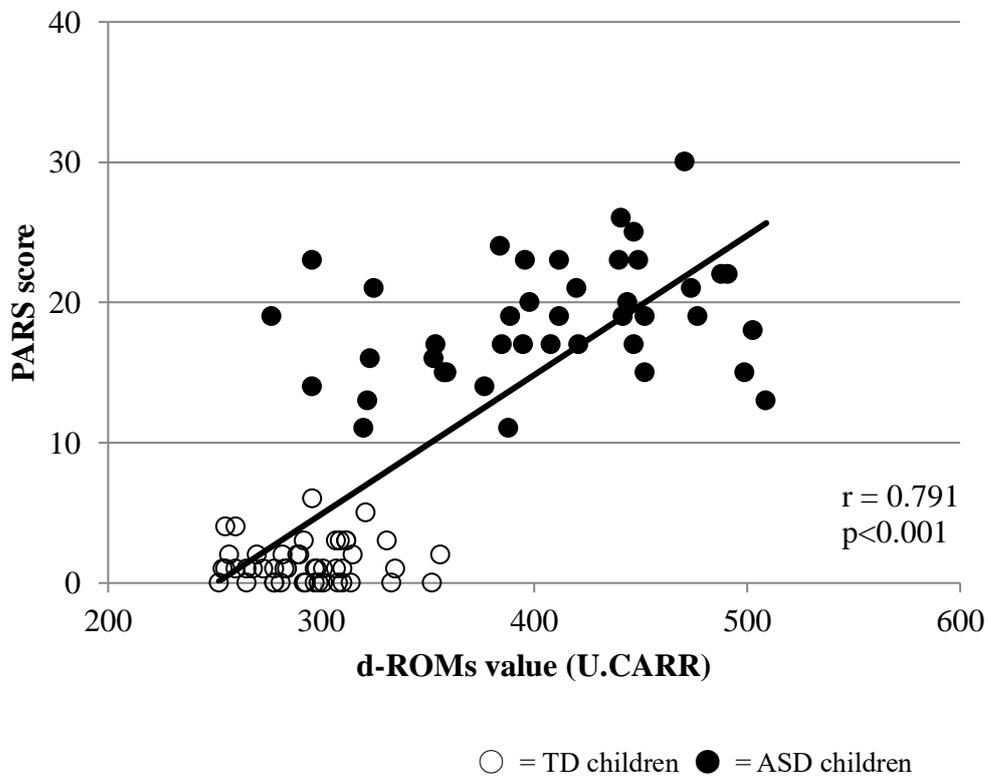


Figure 3A Relationship between PARS scores and BAP levels in group aged 2-6 years.

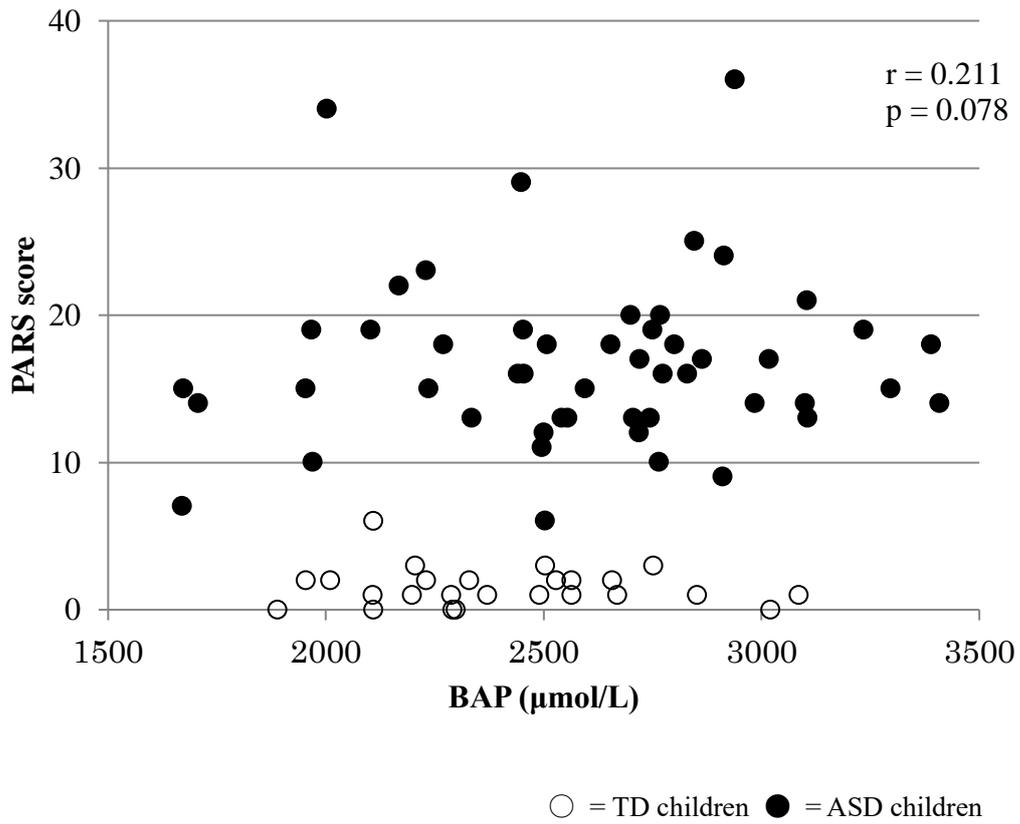
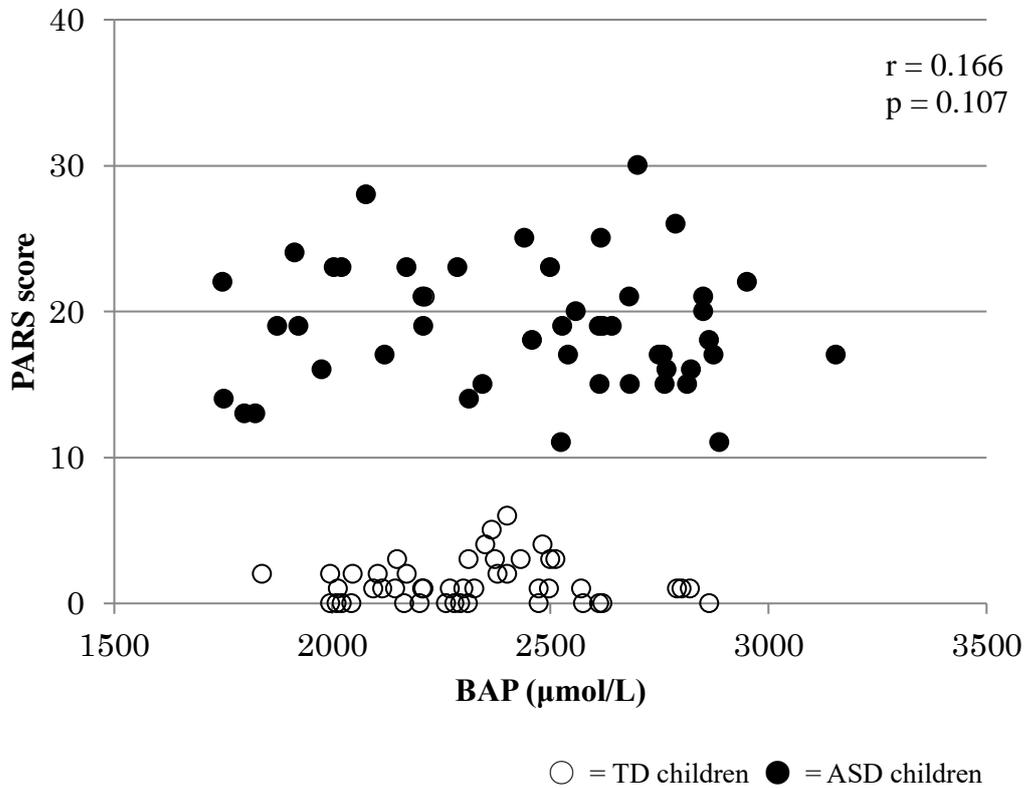


Figure 3B Relationship between PARS scores and BAP levels in group aged 7-15 years.



第八節 小括

d-ROMs は、alkoxy radical や peroxy radical の前駆物質である hydroperoxide を定量的に測定するため、安定性が高い。また、試料は微量の血液であり、5 分間で数値化されることから、侵襲性が低く短時間で判定が可能である¹⁷⁾。さらに再現性も高く³⁵⁾、BAP と併せて評価することで、「酸化」と「抗酸化」の両面から酸化ストレスを知ることができる。

d-ROMs・BAP 値の性差について、Nagata らは性差がないことを報告しており⁶²⁾、本研究もそれを支持する結果となった。

TD 児と ASD 児の d-ROMs 値を比較すると、2-6 歳群では有意差は認められなかった。2-6 歳群において、TD 児と ASD 児の両群の d-ROMs 値は、低年齢であるほど高値であった。これは、他の酸化ストレスマーカー（Acrolein-lysine, Pentosidine, Nitrite/nitrate, 8-OHdG）と同様の傾向であった^{63,64)}。このことは、幼児期は細胞のアポトーシスと再生の回転が早い発達時期であることが関係していると推測される^{65,66)}。また、7-15 歳の就学児と比較し、2-6 歳の幼児は採血に対し不安や恐怖心が強く、これによる心理的ストレスの影響が関与していることも考えられる。

一方、7-15 歳群の TD 児と ASD 児を比較すると、ASD 児の d-ROMs 値が有意に高かった。TD 児は成長とともに d-ROMs 値が低下し、7-15 歳群で健康成人の水準（約 <300 U.CARR）に達するが、ASD 児の d-ROMs 値は低下しなかった。また、7-15 歳群では、ASD 児の BAP/d-ROMs ratio（抗酸化能）は、TD 児に比べ有意に低かった。このことより、ASD 児はストレス対応能力が乏しいため、成長しても酸化ストレスは変

化しないのではないかと推察する。さらに、ASD 児は心理的ストレスも高いことより、就学後の集団生活におけるストレスに常時暴露されていることも本結果の原因ではないかと考える。

また、ASD 患者では、ミトコンドリアに機能障害をきたしているとの報告が散見される^{56,67,68,69)}。フリーラジカルの消去は酵素に依存していることが多く、ミトコンドリア内やその周囲にはラジカル消去作用を有する glutathione peroxidase や catalase などの酵素も含む⁷⁰⁾ことから、d-ROMs 値の増加にはミトコンドリアの機能障害が関与している可能性が推察される。また ASD 患者は、酸化ストレスによるミトコンドリア機能障害と DNA 損傷が、ASD の中核症状を惹起させる報告がある⁶⁹⁾。酸化ストレスによりミトコンドリアの機能障害が生じると、ASD の中核症状が発現・悪化し、ストレスが生じる。さらにそのストレスによりミトコンドリアの機能障害を引き起こす、負の連鎖が構築されてしまうことが推測されるため、定期的な酸化ストレスマーカーの測定は、ASD 児のストレス評価において有用な指標になりうるかもしれない。

一方、生体の抗酸化能は、酸化度や個体が生得的に持っている総合的な酸化能 Total Antioxidant Capacity(TAC)によって影響されると考えられるが、既報では、個々の指標の酸化度だけが報告されている。本研究では、酸化度と抗酸化力を同時に測定することによって、ASD 児の TAC を知るうえで有用な指標として利用できるものと考えられる。

PARS-TR スコアと d-ROMs 値の関係について、PARS-TR スコアが高いほど d-ROMs 値も高くなる有意な相関が認められたことより、主観的評価と客観的指標の関連が示唆された。このことより、d-ROMs は中間表現体として ASD のバイオマーカーとしての信頼性が高まると思われる。同様に、PARS-TR スコアと BAP 値の関係も検討した

が、有意な相関は認められなかった。これは、BAP 値を用いて抗酸化活性を測定するだけでは ASD 児を評価することが困難であることを示唆している。

本研究にはいくつかの限界がある。第 1 に、対象 2 群には様々な除外基準を設けたが、対人関係や生活環境の詳細な調査はできないため、全て純粋な TD 児または ASD 児ではなかったかもしれない。第 2 に、d-ROMs 値、BAP 値が変動した原因となる反応部位を特定できなかった。ASD 児では複数の活性酸素種と抗酸化システムが関与する複雑な機序が存在すると考えられる。d-ROMs test、BAP test は活性酸素・フリーラジカルを直接測定できないため、これらを明らかにするには更に *in vitro* での研究の必要がある。第 3 に、サンプル数が十分とはいえない。Figure 1 では、2-6 歳の TD 児と ASD 児の d-ROMs 値と BAP / d-ROMs 比を分析すると、d-ROMs 値は $p = 0.072$ で、BAP / d-ROMs 比は $p = 0.063$ であった。結果から有意差が見られなかった理由として、2-6 歳の TD 児のサンプルサイズが小さいためである可能性がある。今後の課題として、さらにサンプル数を増やし、*in vitro* での研究と組み合わせて評価することで、ASD 児と酸化ストレスの関連の信憑性を高めていく必要がある。

本研究結果より、d-ROMs 値は、7-15 歳の就学児において、臨床で簡便に用いることが出来る、ASD のストレス評価の客観的指標になりうる可能性が示唆された。また d-ROMs 値は PARS-TR スコアと相関したことから、臨床的重症度の評価にも応用できる可能性が推測された。

第三章 Attention deficit hyperactivity disorder を併存する Autism spectrum disorder における薬物治 療前後の酸化ストレスマーカーd-ROMs・BAP 値の評価

本章の内容に関しては、 Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences 2020; 6:8 に発表済みである。

第一節 序説

ASD は社会的コミュニケーションおよび対人相互性反応の障害、興味の限局と反復的行動を主徴とする神経発達障害である。2013 年に改訂された DSM-5 では、Pervasive developmental disorder (PDD) は ASD へと診断名が変更され、不注意、多動性及び衝動性を特徴とする Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) と ASD の併存 (ASD/ADHD) が認められるようになった¹⁾。近年、ASD/ADHD の有病率は増加傾向にあり⁷¹⁾、医療機関を受診する ASD 患者の約 80%が ADHD を併存しているとの報告もある⁷²⁾。ASD/ADHD は ASD または ADHD 単独群に比べ、適応能力が低く、日常生活でのストレスが高く Quality of life の低下が指摘されている^{73,74)}。また、ASD/ADHD は不安や気分障害など二次障害のリスクが高まるとの報告もある⁷⁵⁾。ASD/ADHD には環境調整、療育指導、心理社会的対応、リハビリテーションなどに併せて薬物療法も選択される。しかし薬物療法の有効性評価には客観的・生物学的な検

査判定基準が乏しく、臨床では主治医や評価者の主観的評価に重点が置かれている。

ASD や ADHD などの神経発達障害は酸化ストレスと関連していることが示唆されており^{10, 76, 77, 78)}、superoxide dismutase (SOD)、NOS、XO、glutathione S-Transferase、PON-1 などの多くの酸化ストレスマーカーが報告されている。^{10, 13, 76, 78)}

しかし、これらのマーカーは、特殊な機器が必要なため、臨床現場で簡便に測定することはできない。

これまで、即時に測定ができる、生体内での総合的な酸化ストレスマーカーの d-ROMs と BAP に着目し、小児の酸化ストレス評価の客観的指標として応用できる可能性を探索してきた。

第一章では、TD 児の d-ROMs ・ BAP 値の傾向が明らかとなり、d-ROMs 値と既存の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG との互換性も示唆された。

さらに第二章では、d-ROMs 値は、7-15 歳の就学児において、臨床で簡便に用いることができる、ASD のストレス評価の客観的指標になりうる可能性が示唆された。

これらの研究結果に基づいて本章では、酸化ストレスマーカーの d-ROMs と BAP が ASD/ADHD 患者の薬物治療評価の客観的指標になりうるかについて検討した。

第二節 方法

1.対象者

対象者は、4-14歳の日本人で、薬物治療介入前の ASD/ADHD 患者 50 人(男 38 人、女 12 人)である。ASD/ADHD 患者の適合基準は、小児神経専門医による診察で、DSM-5 に基づいた評価と臨床症状より、ASD/ADHD と診断された患者とした。発達障害以外の基礎疾患がある患者と ASD または ADHD の治療及び症状改善の目的以外に薬剤を服用している患者は除外した。なお、先行研究より年齢変化における酸化ストレスの影響を考慮し、年齢別では 4-6 歳群(未就学児)と 7-14 歳(就学児)の 2 群に分類した。

2.測定項目

(1)酸化ストレスの指標(d-ROMs test)

d-ROMs test は血清中の hydroperoxide の量を測定することで体内の酸化ストレスを評価する。

(2)抗酸化力の指標(BAP test)

BAP test は三価鉄から二価鉄への還元力を測定することで、生体内のフリーラジカル除去能である抗酸化力を評価する。

(3)抗酸化能 (BAP/d-ROMs ratio)

d-ROMs test と BAP test の測定で得られた値を用い、BAP 値/d-ROMs 値の比を算出

した。そして、抗酸化力/酸化度で算出された比を「抗酸化能」と定義した。

3.測定方法

2016年11月から2019年9月の期間に、治療前の対象者の採血を行い、薬物治療開始後1年以内に再度採血を行った。血液検体は1469Gで10分間遠心分離し、血清を試料とした。d-ROMs値、BAP値の測定はフリーラジカル解析装置「FREE CARRIO DUO」(Diacron International, Grosseto, Italy)を用いて測定した。

4.調査項目

(1) Parent-interview ASD Rating Scales-Text. Revision (PARS-TR)

ASDの発達・行動症状について母親(母親から情報が得がたい場合は他の主養育者)に面接し、その存否と程度をPARS-TRを用いて小児神経専門医が評価を行った。

(2) ADHD Rating Scale(ADHD-RS)

ADHD-RSはADHD症状と程度について他者に面接し、その存否と程度を評定する評価尺度である。今調査では母親(母親から情報が得がたい場合は他の主養育者)の情報から、小児神経専門医が評価を行った。適用年齢は5歳以上、評価項目は不注意に関する9項目と多動・衝動性に関する9項目の全18項目から成る。各項目の程度を4段階(0、1、2、3)で評価し、合計したスコアが高ければADHDを疑う。

5.統計学的検討

対象者の d-ROMs 値、BAP 値、BAP/d-ROMs 比、PARS-TR スコア及び ADHD-RS スコアを Wilcoxon signed-rank test を用いて薬物治療前後を比較し、 $p < 0.05$ を有意とした。d-ROMs 値、BAP 値、及び BAP/d-ROMs 比の薬物治療前後の変化と PARS-TR スコア及び ADHD-RS スコアの薬物治療前後の変化の相関関係について、Pearson correlation coefficient(r)と p 値を算出し、 $p < 0.05$ を有意とした。統計解析ソフトは R(version3.6.1)を使用した。

6.倫理的配慮

本研究において個人名が第三者に特定されないことがないこと、参加は自由意志であり拒否における不利益はないこと、ならびに本研究の目的と内容について対象者本人と家族に文書を用いて説明した。対象者が同意能力を有さない場合は家族から、同意能力を有する場合は家族及び本人から書面にて同意を得た。また、本研究は徳島赤十字ひのみね総合療育センター倫理委員会の承認を得て実施した。

第三節 対象者背景

Table1 に対象者の背景を示す。平均年齢は 8.64 ± 2.46 歳、最小年齢は 4 歳、最高年齢は 14 歳であった。性別は男性が 76.0% で、未就学児、就学児いずれの群においても男性が多かった。

Table1 Background of subjects.

Age(y)		
	Means \pm SD	8.62 \pm 2.46
	Median	8
	Maximum	14
	Minimum	4
Sex		
	Male	38 (76.0%)
	Female	12 (24.0%)
Gender comparison by age group		
4 – 6 y (n=9)	Male	6 (66.7%)
	Female	3 (33.3%)
7 – 14 y (n=41)	Male	32 (78.0%)
	Female	9 (22.0%)

SD = Standard deviation y = years

Table2 に対象者に用いられた治療薬を示す。治療薬は、ASD/ADHD に対して 11 薬剤が使用されており、中でも Guanfacine Hydrochloride (GXR) は未就学児、就学児いずれの群においても最も多く、全体の半数を占めた。

Table3 に対象者に用いられた ASD、ADHD に適応のある薬剤の適応症及び作用機序について示す。いずれの薬剤も脳での神経伝達物質の挙動に働きかけると考えられているが、症状の改善につながる明確な機序は明らかではない。また、本邦において RIS は 5 歳未満、APR、ATX、MPH、GXR は 6 歳未満の患者に適応はない。

Table4 に対象者に用いられた治療薬の組み合わせを示す。単剤が 46%と最も多く、中でも本邦において ADHD の適応がある GXR と Methylphenidate Hydrochloride (MPH) が 16%と最も多かった。併用療法のうち最も多い組み合わせは GXR+MPH と GXR+ARP (8%)であった。

Table2 Drug of subjects

	4-6 years (n=9)	7-14 years (n=41)	All subjects (n=50)
Guanfacine Hydrochloride (GXR)	4 (44.4%)	21 (51.2%)	25 (50.0%)
Methylphenidate Hydrochloride (MPH)	-	18 (43.9%)	18 (36.0%)
Risperidone (RIS)	3 (33.3%)	9 (22.0%)	12 (24.0%)
Aripiprazole (ARP)	3 (33.3%)	8 (19.5%)	11 (22.0%)
Atomoxetine Hydrochloride (ATX)	1 (11.1%)	8 (19.5%)	9 (18.0%)
Ramelteon (RML)	-	2 (5%)	2 (4%)
Hangekobokuto	-	2 (5%)	2 (4%)
Yokukansan	-	2 (5%)	2 (4%)
Yokukansankachimpihange	-	1 (2%)	1 (2%)
Sertraline Hydrochloride (STL)	-	1 (2%)	1 (2%)
Sodium Valproate (VPA)	1 (11.1%)	-	1 (2%)

※ Each of these drugs may also be used in combination

Table3 Indications and mechanism of action of drugs indicated for ASD and ADHD

Risperidone (RIS)	
適応症	小児期の ASD に伴う易刺激性（原則として 5 歳以上 18 歳未満の患者）
作用機序	主としてドパミン D2 受容体拮抗作用及びセロトニン 5-HT ₂ 受容体拮抗作用に基づく、中枢神経系の調節によるものと考えられる ⁷⁹⁾ 。
Aripiprazole (ARP)	
適応症	小児期の ASD に伴う易刺激性（原則として 6 歳以上 18 歳未満の患者）
作用機序	ドパミン D2 受容体部分アゴニスト作用、ドパミン D3 受容体部分アゴニスト作用、セロトニン 5-HT _{1A} 受容体部分アゴニスト作用及びセロトニン 5-HT _{2A} 受容体アンタゴニスト作用を併せ持つ。明確な機序は不明であるが、これらの薬理作用が臨床における有用性に寄与しているものと考えられる ⁸⁰⁾ 。
Atomoxetine Hydrochloride (ATX)	
適応症	ADHD（6 歳未満の患者における有効性及び安全性は確立していない）
作用機序	神経終末において、ノルアドレナリンの再取り込みを阻害して薬効を示す。ノルアドレナリントランスポーターに対する選択的阻害作用が関与していることが可能性として考えられるが、ADHD の治療効果における詳細な作用機序は十分に解明されていない ⁸¹⁾ 。
Methylphenidate Hydrochloride (MPH)	
適応症	ADHD（6 歳未満の患者における有効性及び安全性は確立していない）
作用機序	ドパミン及びノルアドレナリントランスポーターに結合し再取り込みを抑制することにより、シナプス間隙に存在するドパミン及びノルアドレナリンを増加させて神経系の機能を亢進するものと考えられているが、ADHD の治療効果における詳細な作用機序は十分に解明されていない ⁸²⁾ 。
Guanfacine Hydrochloride (GXR)	
適応症	ADHD（6 歳未満の患者における有効性及び安全性は確立していない）
作用機序	アドレナリン受容体（ α 2A）に対して親和性を示し、 α 2 アドレナリン受容体を介した直接的なノルアドレナリンのシナプス伝達調整により、前頭前皮質及び大脳基底核におけるシグナルを調整している可能性が示唆されているが、ADHD の治療効果における詳細な作用機序は十分に解明されていない ⁸³⁾ 。

Table4 Drug combination of subjects

		All subjects (n=50)	
Single-drug therapy	GXR	8 (16.0%)	
	MPH	8 (16.0%)	
	ATX	4 (8%)	23 (46.0%)
	RIS	2 (4%)	
	VPA	1 (2%)	
Two-drug combination	GXR + MPH	4 (8%)	
	GXR + MPH	4 (8%)	
	GXR + ARP	4 (8%)	
	GXR + RIS	2 (4%)	
	MPH + RIS	2 (4%)	
	ATX + RIS	2 (4%)	
	GXR + ATX	1 (2%)	21 (42.0%)
	GXR + STL	1 (2%)	
	GXR + Hangekobokuto	1 (2%)	
	MPH + ARP	1 (2%)	
	RIS + ARP	1 (2%)	
	ARP + Yokukansan	1 (2%)	
	RIS + Yokukansankachimpihange	1 (2%)	
Three-drug combination	GXR + MPH + ARP	3 (6%)	
	ATX + RIS + RML	1 (2%)	5 (10.0%)
	ATX + RIS + Yokukansan	1 (2%)	
Five-drug combination	GXR + ARP + RIS+ RML + Hangekobokuto		1 (2%)

第四節 治療前後の各測定値の変化

Table5 に対象者の治療前後の各測定値の変化を示す。全対象者では治療後 d-ROMs 値、BAP 値、PARS-TR 及び ADHD-RS のスコアは有意に減少し(d-ROMs: $p < 0.001$ BAP: $p = 0.007$ PARS-TR: $p < 0.001$ ADHD-RS: $p < 0.001$)、BAP/d-ROMs 比は有意に増加した($p < 0.001$)。また、未就学児では d-ROMs 値が治療後有意に減少した($p = 0.004$)。一方、就学児では治療後 d-ROMs 値、PARS-TR 及び ADHD-RS のスコアは有意に減少し(d-ROMs: $p < 0.001$ PARS-TR: $p < 0.001$ ADHD-RS: $p < 0.001$)、BAP/d-ROMs 比は有意に増加した(BAP/d-ROMs ratio: $p < 0.001$)。

Table5 The pre- to post-treatment changes in objective markers and subjective scores.

All subjects	Before	After	Change*	p**
d-ROMs(U.CARR)	413.1	363.3	49.8	<0.001
BAP(μ mol/L)	2521.5	2403.3	118.2	0.007
BAP/d-ROMs	6.16	6.65	-0.50	<0.001
ADHD-RS	27.4	15.4	12.0	<0.001
PARS-TR	21.3	13.2	8.18	<0.001
4-6 years				
d-ROMs(U.CARR)	443.8	381.6	62.2	0.004
BAP(μ mol/L)	2679.6	2467.4	212.1	0.05
BAP/d-ROMs	6.13	6.51	-0.38	0.13
ADHD-RS	24.7	17.4	7.22	0.14
PARS-TR	19.4	12.3	7.11	0.008
7-14 years				
d-ROMs(U.CARR)	406.3	359.2	47.1	<0.001
BAP(μ mol/L)	2486.8	2389.2	97.6	0.03
BAP/d-ROMs	6.16	6.68	-0.52	<0.001
ADHD-RS	28.0	15.0	13.0	<0.001
PARS-TR	21.7	13.3	8.4	<0.001

*Change is the score obtained by subtracting the score after treatment from the score before treatment.

** Wilcoxon signed-rank test was used to compute p-values

第五節 主観的評価と客観的評価の治療前後の変化の関係

Table6 に対象者の d-ROMs 値、BAP 値、及び BAP/d-ROMs 比と PARS-TR スコア及び ADHD-RS スコアの薬物治療前後の変化の関係を示す。全対象者では d-ROMs 値と PARS-TR スコアの治療前後の変化に有意な正の相関が認められ($r = 0.34, p = 0.02$)、d-ROMs 値と ADHD-RS スコアの治療前後の変化でも有意な正の相関が認められた($r = 0.29, p = 0.04$)。

Figure1,2 に年齢別 2 群での d-ROMs 値と PARS-TR 及び ADHD-RS スコアの薬物治療前後の変化の関係を示す。就学児では d-ROMs 値と PARS-TR スコアの治療前後の変化に有意な相関が認められ($r = 0.39, p = 0.01$)、d-ROMs 値と ADHD-RS スコアの治療前後の変化にも有意な相関が認められた($r = 0.44, p = 0.004$)。一方、未就学児ではいずれの項目においても有意な相関は認められなかった。

Table6 Correlation between change in objective markers and changes in subjective scores.

	ADHD-RS		PARS-TR	
	r*	p	r	p
All subjects				
d-ROMs(U.CARR)	0.29	0.04	0.34	0.02
BAP(μ mol/L)	0.09	0.51	0.17	0.24
BAP/d-ROMs	-0.14	0.32	-0.11	0.46
4-6 years				
d-ROMs(U.CARR)	-0.06	0.88	0.30	0.44
BAP(μ mol/L)	-0.11	0.78	0.05	0.89
BAP/d-ROMs	-0.12	0.77	-0.23	0.55
7-14 years				
d-ROMs(U.CARR)	0.44	0.004	0.39	0.01
BAP(μ mol/L)	0.16	0.31	0.19	0.22
BAP/d-ROMs	-0.14	0.39	-0.09	0.58

* Pearson correlation coefficient

Figure 1 Relationship between change in PARS-TR score and change in d-ROMs levels.

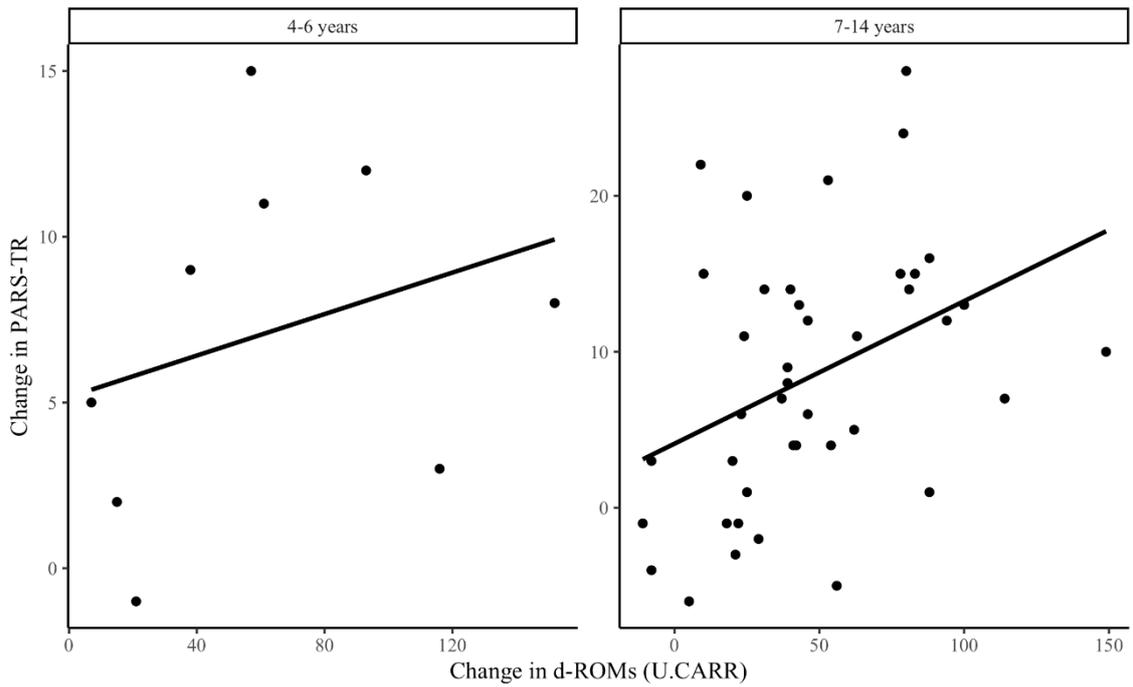
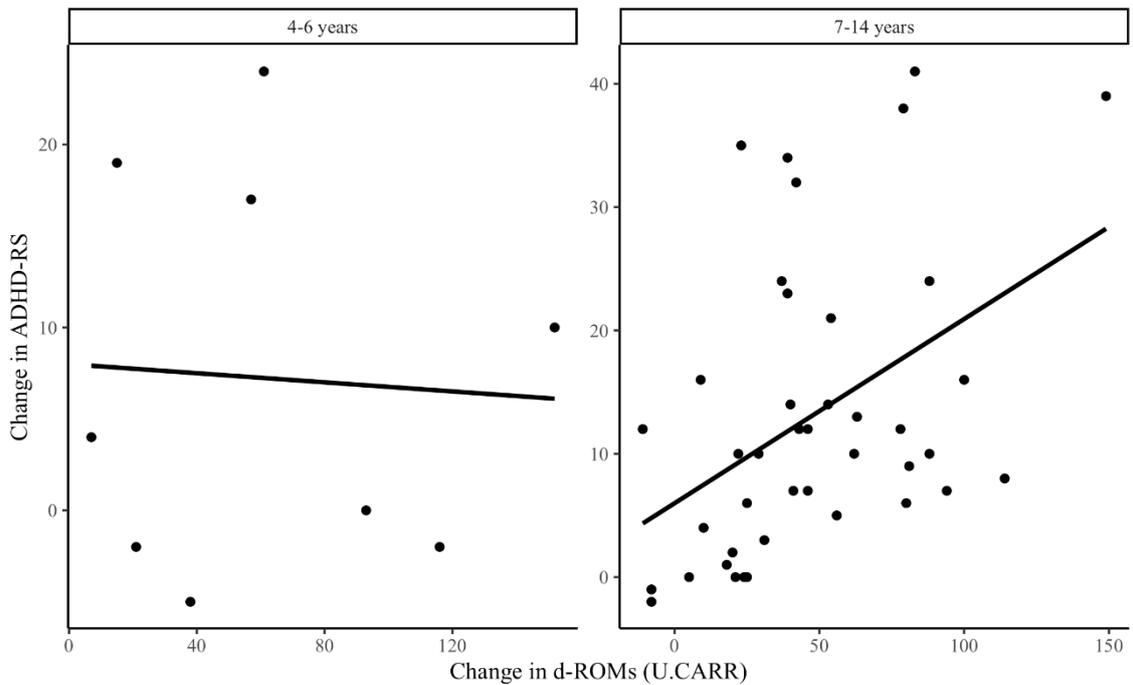


Figure 2 Relationship between change in ADHD-RS score and change in d-ROMs levels.



第六節 小括

本研究において薬物療法開始後、d-ROMs 値、PARS-TR 及び ADHD-RS スコアは有意に減少し、BAP/d-ROMs 比は有意に増加した。また、就学児の ASD/ADHD 患者において d-ROMs 値と PARS-TR 及び ADHD-RS スコアの薬物治療開始前後の変化の関係において有意な相関関係が認められ、主観的評価と客観的指標の関連が示唆された。

小児期における ADHD の男女比は 2:1-10:1^{84,85)}、ASD の男女比は 4:1⁵⁾ との報告がある。本研究対象者も約 8 割が男性であり、疫学的報告からも発達障害は男性の有病率が高い⁸⁶⁾。性差の影響は優先して考慮すべき要因であるが、d-ROMs と BAP 値の性差について、Nagata らは性差がないことを報告しており⁶²⁾、我々の研究においても第一、二章で既に性差がないことを確認しているため、d-ROMs 値と BAP 値は性差に影響されない指標であることが推察される。

さらに、第一章において d-ROMs 値は、2-6 歳群において 7-11 歳群または 12-15 歳群よりも有意に高値であった。また、就学前と学校生活の間の環境の変化は、子供が受けるストレスのレベルが異なることが報告されている⁶¹⁾。d-ROMs 値は、ASD/ADHD の就学児よりも未就学児の方が高値であり、本研究でも同様の傾向が観察された。これらの発見は、小児期の急速なシナプスの剪定と再生^{65,66)}に関連すると推測された。さらに、未就学児は不安や血液採取に対する恐怖が強いため、不安や恐怖からの心理的ストレスの影響も考えられる。

ASD は心理的ストレスにより不安障害、気分障害、恐怖症を含む感情障害を併発することが多く⁸⁷⁾、攻撃行動や自傷行為、癩癩、不眠などといった問題行動を表しやす

い⁸⁸⁾。

本研究の対象者においても、これら二次障害の治療薬として気分安定薬の VPA や睡眠障害治療薬の RML を用いた患者が認められている。また、ミトコンドリア機能障害や環境要因によって引き起こされる酸化ストレスの上昇は ASD 患者の脳機能障害の要因の一つとされ、ASD 患者では酸化ストレスの亢進状態が推察される^{10,76)}。一方、ADHD においても、酸化-抗酸化状態のバランスの低下と酸化ストレスの増加に関する報告がされており^{77,78)}、ASD/ADHD 患者での酸化ストレスの亢進状態や抗酸化能の低下が推察される。

本研究では、治療後に d-ROMs 値の有意な減少と BAP/d-ROMs 比の有意な増加が認められた。また、観察に基づく主観的な指標である PARS-TR と ADHD-RS の両スコアは、治療開始後に大幅に減少した。これらの結果は、薬物療法によって誘発される行動の変化と中核症状の改善は、日常生活の心理的ストレスを軽減する要因であり、それによって d-ROMs 値と BAP/ d-ROMs 比が変動した可能性を示唆している。

また、今研究の対象者とその療育者に対しては、診療時に薬物療法だけではなく、心理的及び教育的療育対応も行っている。患者やその療育者に対する療育指導により、日常生活における心理的ストレスが軽減した結果、d-ROMs 値、BAP/d-ROMs 比が変動した可能性も考えられる。

今研究の ASD/ADHD 患者に対しては、治療薬として 11 薬剤が使用されていた。中でも 24.0%の対象者が服用していた RIS はミトコンドリア機能障害を減弱させるとの報告⁸⁹⁾があり、治療後に d-ROMs 値が減少した要因としての可能性は否定できない。また、ATX は高濃度においてミトコンドリア機能障害を引き起こすことが報告

⁹⁰⁾ されており、薬物の適切な用量選択における客観的バイオマーカーを用いた酸化ストレス評価の必要性は高いと考えられた。

ADHD に対する GXR、ATX、MPH や ASD に対する ARP は 6 歳未満、ASD に対する RIS は 5 歳未満において有効性と安全性が確立されておらず、本邦では適用外であり、未就学児の ASD/ADHD に対する薬物治療のエビデンスは乏しい。本研究では、年齢や学校など生活環境によるストレスの影響を考慮し、未就学児と就学児の 2 群での検討を行ったが、未就学児では PARS-TR 及び ADHD-RS スコアともに治療前後での変化はなかった。このことは、PARS-TR スコアにおいて未就学児と就学児ではカットオフ値が異なること⁹¹⁾、また ADHD-RS スコアにおいては適用年齢が 5 歳以上であり 4 歳児の評価が困難であったことが影響した可能性が考えられる。

本研究にはいくつかの限界がある。第 1 に、対象者の対人関係や生活環境の詳細な調査はできず、今結果への影響が検証できなかったことである。第 2 に、療育指導のみの患者の採血が実施できなかったことである。今研究の対象者は薬物療法を行った患者が対象だが、薬物療法を行わず、心理的及び教育的療育対応等の療育指導のみで経過を見る例もある。今後の課題として、薬物療法の有用性を示すために薬物療法+療育指導群と療育指導単独群との比較検討が必要である。第 3 に、サンプル数が十分ではなかったことである。特に未就学児のサンプル数は少なかった。また、使用薬剤の組み合わせも多く、薬剤毎の酸化ストレスマーカーの評価ができなかった。今後の課題として、サンプル数をさらに増やし、使用薬剤毎の酸化ストレスマーカーへの影響や未就学児での再検証の必要がある。

本研究では薬物療法開始後において、d-ROMs 値、PARS-TR 及び ADHD-RS スコア

は有意に減少した。また、就学児の ASD/ADHD 患者において d-ROMs 値と PARS-TR 及び ADHD-RS スコアの薬物治療前後の変化の関係において有意な相関関係が認められ、主観的評価と客観的指標の関連が示唆された。

これらのことから、酸化ストレスマーカーの d-ROMs は就学児における ASD/ADHD 患者に対する薬物治療効果の評価に応用できる可能性が推測された。

総括

2005年より施行された「発達障害者支援法」ではこれまで支援の対象外であった知的障害を伴わない発達障害が支援の対象となった。さらに2016年の法改正では、支援体制が強化され、発達障害と診断された場合に利用できる福祉サービスは増えている。

ASDは社会的コミュニケーション能力の欠如及び限定された行動・興味を特徴とする発達障害であり、その発症率は近年世界的に増加傾向にあり、2016年の米国CDCのサーベイランスでは発症数は54人に1人とされている³⁾。

ASDの診断はDSM-5で基準が定められているが、最終的に採用する情報は評価者に委ねられ、基準となる症状を満たすカットオフラインは曖昧である。また、治療方針は養育者から得られた情報や医師の所見に基づき、患児の発達状況を考慮したうえで選択されるが、治療評価の客観的指標はない。薬物療法では、特に小児の場合、副作用の観点からも適正な用量が求められるため、治療評価の客観的指標の必要性は高い。

本研究では、迅速かつ簡便な手技で安定した評価が可能な酸化ストレスマーカーのd-ROMs、BAPがASDの診断・治療評価等に臨床で応用できるかを検討した。

その結果、d-ROMsは、就学児においてASDの酸化ストレス評価の客観的指標になりうる可能性が示唆された。またd-ROMs値が観察に基づく主観的評価の値と相関したことより、臨床的重症度の評価も応用できる可能性が明らかになった。

さらに、就学児の ASD/ADHD では d-ROMs と主観的評価の薬物治療前後の変化値に有意な相関関係が認められたことより、就学児の ASD/ADHD に対する薬物治療効果の評価に d-ROMs が応用できる可能性も明らかになった。

以上のことから、d-ROMs は、就学児における ASD の病態及び薬物治療評価に対して、臨床症状や主観的評価スコアに付帯するマーカーとして臨床で即時に応用できる有用な客観的指標であると考えられる。

参考文献

- 1) American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders,5th edition (DSM-5). Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
- 2) American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders,4th edition (DSM-4). Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.
- 3) Maenner MJ, Shaw KA, Baio J; EdS1, Washington A, Patrick M, DiRienzo M, Christensen DL, Wiggins LD, Pettygrove S, Andrews JG, Lopez M, Hudson A, Baroud T, Schwenk Y, White T, Rosenberg CR, Lee LC, Harrington RA, Huston M, Hewitt A; PhD-7, Esler A, Hall-Lande J, Poynter JN, Hallas-Muchow L, Constantino JN, Fitzgerald RT, Zahorodny W, Shenouda J, Daniels JL, Warren Z, Vehorn A, Salinas A, Durkin MS, Dietz PM. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR Surveill Summ.* 2020; 69(4):1-12.
- 4) Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res* 2012;5:160-179.
- 5) Fombonne E. Epidemiological Surveys of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *J Autism Dev Disord.* 2003;33:365-82.
- 6) Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet.* 2008;9:341-55.

- 7) Freitag CM. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance a review of the literature. *Mol Psychiatry*. 2007;12:2-22.
- 8) Pinto D, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010;466:368-72.
- 9) Sebat J, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007;316:445-9.
- 10) Waligora A, Waligora S, Kozarska M, Damasiewicz-Bodzek A, Gorczyca P, Tyrpien-Golder K. Autism spectrum disorder (ASD) - biomarkers of oxidative stress and methylation and transsulfuration cycle. *Psychiatr. Pol*. 2019; 53: 771-88.
- 11) Lopresti AL. Oxidative and nitrosative stress in ADHD: possible causes and the potential of antioxidant-targeted therapies. *Atten Defic Hyperact Disord* 2015; 7: 237-47.
- 12) Frustaci A, Neri M, Cesario A, et al. Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 2128-41.
- 13) Ceylan MF, Sener S, Bayraktar AC, Kavutcu M. Changes in oxidative stress and cellular immunity serum markers in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 2012; 66: 220-6.

- 14) Yui K, Kawasaki Y, Yamada H, Ogawa S. Oxidative Stress and Nitric Oxide in Autism Spectrum Disorder and Other Neuropsychiatric Disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2016; 15: 587-96.
- 15) Naito Y, Lee MC, Kato Y, et al. Oxidative Stress Markers. *Anti-Aging Medicine*. 2010; 7: 36-44.
- 16) Sakai K, Ochi T, Takeuchi M. An oxidative stress marker:8-OHdG. *Journal of Analytical Bio-Science*. 2009; 32: 297-300.
- 17) Jansen E, Ruskovska T. Serum Biomarkers of (Anti)Oxidant Status for Epidemiological Studies. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 27378-90.
- 18) Nakajima A, Aoki Y, Shibata Y, et al. Identification of clinical parameters associated with serum oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2014; 24: 926-30.
- 19) Chung DH, Lee KH, Kim SW, Shin SY, Cho JS. Comparison of pre- and post-operative stress levels in patients with allergic rhinitis and non-allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012; 269: 2355-9.
- 20) Suzuki Y, Imai K, Takai K, et al. Hepatocellular carcinoma patients with increased oxidative stress levels are prone to recurrence after curative treatment: a prospective case series study

using the d-ROM test. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 845-52.

- 21) Yoshikawa T. Free Radicals and Medicine. *J Kyoto Pref Univ Med.* 2011; 120: 381-391.
- 22) Nojima J, Motoki Y, Tsuneoka H, et al. 'Oxidation stress index' as a possible clinical marker for the evaluation of non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2011; 155: 528-530.
- 23) Nagata K, Kondo A, Fujimori J, Tatsuse T. d-ROMs test, BAP test and the modified BAP/d-ROMs ratio (the oxidative balance regulation system) as new biomarkers. *Jap J Stress Sci* 2014; 29: 281-92.
- 24) Tsukahara H. Oxidative stress control and pediatric disease treatment. *J Jpn Pediatr Soc.* 2017; 121: 527-535.
- 25) Tamura S, Tsukahara H, Ueno M, et al. Evaluation of a urinary multi-parameter biomarker set for oxidative stress in children, adolescents and young adults. *Free Radic Res.* 2006; 40:1198-1205.
- 26) Alberti A, Bolognini L, Macciantelli D, Caratelli M. The Radical Cation of N,N-diethyl-para-Phenylendiamine : A Possible Indicator of Oxidative Stress in Biological Samples. *Res Chem Intermed* 2000; 26(3): 253-67.
- 27) Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, Canestrari F.

Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clinical Biochemistry*. 2004. 37: 312–317.

28) Naruse R, Suetsugu M, Terasawa T, Ito K, Hara K, Takebayashi K, et al. Oxidative stress and antioxidative potency are closely associated with diabetic retinopathy and nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Saudi Med J* 2013; 34(2): 135-41.

29) Baba Y, Hayashi S, Nagasato K, Higashi M, Tosuji N, Sonoda S, et al. Oxidative stress induced by portal vein embolization in fatty liver: Experimental study of a nonalcoholic steatohepatitis model. *Biomed Rep* 2018; 9(4): 357-63.

30) Morimoto M, Satomura S, Hashimoto T, Kyotani S. A study of oxidative stress and the newer antiepileptic drugs in epilepsy associated with severe motor and intellectual disabilities. *J Chin Med Assoc* 2017; 80(1): 19-28.

31) Yagi H, Sumino H, Yoshida K, Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, et al. Biological Antioxidant Potential Negatively Correlates With Carotid Artery Intima-Media Thickness. *Int Heart J* 2016; 57(2): 220-5.

32) Sugiura T, Dohi Y, Takase H, et al. Increased reactive oxygen metabolites is associated with cardiovascular risk factors and vascular endothelial damage in middle-aged Japanese subjects.

Vasc Health Risk Manag. 2011; 7: 475-482.

33) Kotani K, Sakane N. C-reactive protein and reactive oxygen metabolites in subjects with metabolic syndrome. *J Int Med Res.* 2012; 40: 1074-1081.

34) Kilik K, Meitern R, Härmson O, et al. Assessment of oxidative stress in serum by d-ROMs test. *Free Radic Res.* 2014; 48: 883-889.

35) Nojima J, Miyakawa M, Kodama M, et al. Measurement of the oxidation stress degree by the automated analyzer JCA—BM 1650. *Japanese Journal of Medical Technology.* 2010; 59: 199-207.

36) Vassalle C, Bianchi S, Battaglia D, et al. Elevated levels of oxidative stress as a prognostic predictor of major adverse cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb.* 2012; 19: 712-717.

37) Coaccioli S, Standoli ML, Biondi R, et al. Open comparison study of oxidative stress markers between patients with chronic renal failure in conservative therapy and patients in haemodialysis. *Clin Ter.* 2010; 161: 435-439.

38) Daniil ZD, Papageorgiou E, Koutsokera A, et al. Serum levels of oxidative stress as a marker of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21:

26-31.

39) Taguchi I, Toyoda S, Takano K, et al. Irbesartan, an angiotensin receptor blocker, exhibits metabolic, anti-inflammatory and antioxidative effects in patients with high-risk hypertension.

Hypertens Res. 2013; 36: 608-613.

40) Horvat P, Kubinova R, Pajak A, et al. Blood-Based Oxidative Stress Markers and Cognitive Performance in Early Old Age: The HAPIEE Study. Dement Geriatr Cogn Disord. 2016; 42:

297-309.

41) Faienza MF, Francavilla R, Goffredo R, et al. Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. Horm Res Paediatr. 2012; 78: 158-164.

42) Yamanaka G, Ishii C, Kawashima H, et al. Cerebrospinal fluid Diacron-Reactive Oxygen Metabolite levels in pediatric patients with central nervous system diseases. Pediatr Neurol.

2008; 39: 80-84.

43) Tsukahara H, Hiraoka M, Mori Y, et al. Evaluation of oxidative stress status in patients with congenial kidney and urinary tract anomalies by using reference values obtained in our institution. Japanese Journal of Pediatric Nephrology. 2007; 20: 131-135.

44) Hallynck T, et al. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine concentration

based on lean body mass. *Clin Pharmacol Ther.* 1981; 30: 414-421.

45) Endres W, Seibold H. Renal excretion of cystathionine and creatinine in humans at different ages. *Clin Chim Acta.* 1978; 87: 425-432.

46) Okamura K. Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans. *Free Rad Res.* 1997 ; 26: 507-514.

47) Yamami N, Kongoji J, Nakayama H, et al. A discussion on oxidative and antioxidative markers under a hyperbaric oxygen environment. *The Japanese journal of hyperbaric and undersea medicine.* 2007; 42: 85-91.

48) Hong JY, Sato FE, Kira Y, et al. Curcuma Aromatica Inhibits Diabetic Nephropathy in the Rat. *Journal of Food Science.* 2006; 71: 626-632.

49) Fleming D. Walter B. Cannon and homeostasis. *Soc Res.*1984; 51: 609-640.

50) Matson JL, Williams LW. Depression and mood disorder among persons with autism spectrum disorders. *Res Dev Disabil* 2014; 35: 2003-7.

51) van Steensel FJ, Bögels SM, Perrin S. Anxiety disorders in children and adolescents with autistic spectrum disorders: a meta-analysis. *Clin Child Fam Psychol Rev* 2011; 14: 302-17.

52) Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism. *Lancet* 2014; 383: 896–910.

- 53) Dickstein DP. The Path to Somewhere: Moving Toward a Better Biological Understanding of Irritability. *Am J Psychiatry* 2015; 172: 603-5.
- 54) Cohly HH, Panja A. Immunological findings in autism. *Int Rev Neurobiol* 2005; 71: 317–41.
- 55) Masi A, Quintana DS, Glozier N, Lloyd AR, Hickie IB, Guastella AJ. Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2015; 20(4): 440–6.
- 56) Rose S, Frye RE, Slattery J, Wynne R, Tippett M, Pavliv O, et al. Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction in a subset of autism lymphoblastoid cell lines in a well-matched case control cohort. *PLoS One* 2014; 9(1): e85436.
- 57) Øien RA, Schjølberg S, Volkmar FR, et al. Clinical Features of Children with Autism Who Passed 18-Month Screening. *Pediatrics* 2018; 141: e20173596.
- 58) Söğüt S, Zoroğlu SS, Ozyurt H, Yilmaz HR, Ozuğurlu F, Sivasli E, et al. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *Clin Chim Acta* 2003; 331(1-2):111-7.
- 59) Al-Gadani Y, El-Ansary A, Attas O, Al-Ayadhi L. Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children. *Clin Biochem* 2009;42(10-

11):1032-40.

60) Skalny AV, Simashkova NV, Skalnaya AA, Klyushnik TP, Zhegalova IV, Grabeklis AR,

et al. Trace element levels are associated with neuroinflammatory markers in children

with autistic spectrum disorder. *J Trace Elem Med Biol* 2018; 50: 622-28.

61) Outui K, Umemoto M. Assessment of environmental change at the time of school

enrollment based on direct observation. *Kinki university faculty of applied sociology*

departmental bulletin paper 2017; 2: 1-17.

62) Nagata K, Hasegawa T, Hirokado Y, Kiyama K, Otsuki C. Lifestyle - related diseases and

the oxidative stress regulation system. *Jpn J Psychosom Med* 2008; 48: 177-83.

63) Tsukahara H. Biomarkers for oxidative stress: Clinical application in pediatric medicine.

Curr Med Chem 2007; 14: 339-51.

64) Drury JA, Jeffers G, Cooke RW. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in infants and

children. *Free Radic Res* 1998; 28: 423-8.

65) Huttenlocher PR, de Courten C, Garey LJ, Van der Loos H. Synaptogenesis in human

visual cortex--evidence for synapse elimination during normal development.

Neurosci Lett 1982; 33(3): 247-52.

- 66) Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2011; 14(3): 285-93.
- 67) Kaur K, Chauhan V, Gu F, Chauhan A. Bisphenol A induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphoblasts from children with autism and unaffected siblings. *Free Radic Biol Med* 2014; 76: 25-33.
- 68) Khemakhem AM, Frye RE, El-Ansary A, Al-Ayadhi L, Bacha AB. Novel biomarkers of metabolic dysfunction in autism spectrum disorder: potential for biological diagnostic markers. *Metab Brain Dis* 2017; 32: 1983-97.
- 69) Tang G, Gutierrez Rios P, Kuo SH, et al. Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. *Neurobiol Dis* 2013; 54: 349-61.
- 70) Fujita T. Formation and Removal of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxides and Free Radicals, and Their Biological Effects. *Yakugaku Zasshi* 2002; 122: 203-18.
- 71) Reiersen AM, Todd RD. Co-occurrence of ADHD and autism spectrum disorders: phenomenology and treatment. *Expert Rev Neurother*.2008;8:657-69.
- 72) Joshi G, Petty C, Wozniak J, Henin A, Fried R, Galdo M, Kotarski M, Walls S, Biederman J. The heavy burden of psychiatric comorbidity in youth with autism spectrum disorders: a large

comparative study of a psychiatrically referred population. *J Autism Dev Disord.* 2010;40:1361-

73) Sikora DM, Vora P, Coury DL, Rosenberg D. Attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms, adaptive functioning, and quality of life in children with autism spectrum disorder.

Pediatrics. 2012;130(Suppl 2):S91-7.

74) Goldstein S, Schwabach AJ. The comorbidity of Pervasive Developmental Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: results of a retrospective chart review. *J Autism Dev*

Disord. 2004; 34:329-39.

75) Gordon-Lipkin E, Marvin AR, Law JK, Lipkin PH. Anxiety and Mood Disorder in Children With Autism Spectrum Disorder and ADHD. *Pediatrics.* 2018; 141: e20171377.

76) Yenkyan K, Harutyunyan H, Harutyunyan A. A certain role of SOD/CAT imbalance in pathogenesis of autism spectrum disorders. *Free Radic Biol Med.* 2018;123:85-95.

77) Karababa IF, Savas SN, Selek S, Cicek E, Cicek EI, Asoglu M, Bayazit H, Kandemir H, Kati M, Ulas T. Homocysteine levels and oxidative stress parameters in patients with adult ADHD. *J Atten Disord.* 2017;21:487-93.

78) Lee JY, Hwang IW, Lim MH, Kwon HJ, Jin HJ. Association of glutathione S-transferases M1, T1 and P1 gene polymorphisms with attention deficit and hyperactivity disorder in Korean

children. *Gene*. 2016;586:228-33.

- 79) ヤンセンファーマ株式会社, リスペリドン錠インタビューフォーム,2020;5:18-19
- 80) 大塚製薬株式会社, アリピプラゾール製剤インタビューフォーム,2020;9:37-46
- 81) 日本イーライリリー株式会社, アトモキセチン塩酸塩カプセルインタビューフォーム, 2020;7:69-76
- 82) ヤンセンファーマ株式会社, コンサータ錠インタビューフォーム,2014;5:12-13
- 83) 塩野義製薬株式会社, インチュニブ錠インタビューフォーム,2020;7:70-72
- 84) Gingerich KJ, Turnock P, Litfin JK, Rosen LA. Diversity and attention deficit hyperactivity disorder. *J Clin Psychol*. 1998;54:415-26.
- 85) Stevenson JC, Everson PM, Williams DC, Hipskind G, Grimes M, Mahoney ER. Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) symptoms and digit ratios in a college sample. *Am J Hum Biol*. 2007;19:41-50.
- 86) Loke H, Harley V, Lee J. Biological factors underlying sex differences in neurological disorders. *Int J Biochem Cell Biol*.2015;65:139-50.
- 87) Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. Psychiatric Disorders in Children with Autism Spectrum Disorders: Prevalence, Comorbidity, and Associated Factors

in a Population-Derived Sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008; 47:921-9.

88) Betty P V Ho, Stephenson J, Carter M. Anger in children with autism spectrum disorder:

Parent's perspective. *International Journal of Special Education*. 2012;27:14-32.

89) Debapriya Garabadu , Ausaf Ahmad, Sairam , Krishnamurthy. Risperidone Attenuates

Modified Stress–Re-stress Paradigm-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in

Rats Exhibiting Post-traumatic Stress Disorder-Like Symptoms. *Journal of Molecular*

Neuroscience.2015;56:299-312

90) Corona J, Carreón-Trujillo , González-Pérez , Gómez-Bautista , Vázquez-González ,

Salazar-García . Atomoxetine produces oxidative stress and alters mitochondrial function in

human neuron-like cells. *Scientific Reports* 2019; 9: 13011

91) Tsujii M, Yukihiro T, Adachi J, Ichikawa H, Inoue M, Uchiyama T. Reliability and validity

of the infant part of the PARS. *Jpn J Clin psychiatr* 2006; 35: 1119-26.

発表論文

第一章

Morimoto M, Hashimoto T, Tsuda Y, **Kitaoka T**, Kyotani S, Evaluation of oxidative stress and antioxidant capacity in healthy children. *Journal of the Chinese Medical Association*. **2019** Aug;82(8):651-654.

第二章

Morimoto M, Hashimoto T, Tsuda Y, Nakatsu T, **Kitaoka T**, Kyotani S, Assessment of oxidative stress in autism spectrum disorder using reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential. *PLoS One* **2020** May 22;15(5).

第三章

Kitaoka T, Morimoto M, Hashimoto T, Tsuda Y, Nakatsu T, Kyotani S, Evaluation of the efficacy of drug treatment based on measurement of the oxidative stress, using reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential, in children with autism spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences* **2020** Apr 25;6:8.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始温かい激励と御指導、御鞭撻を賜りました、指導教官である徳島文理大学薬学部 京谷庄二郎教授に、心より拝謝致します。

学位論文審査において、貴重な御指導と御助言を頂きました、徳島文理大学薬学部 井上正久教授、同 喜多紗斗美教授、同 角大悟教授、徳島大学薬学部 土屋浩一郎教授に、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大な御助言を賜りました、徳島赤十字ひのみね総合療育センター顧問 橋本俊顕博士、同センター園長 中津忠則博士、同センター小児科 津田芳見博士に、深謝致します。そして、研究の基礎をはじめとする様々な知見を御教授頂き、いつも温かく励まして頂きました、同センター診療部薬剤課 森本真仁博士に、深く感謝致します。

また、研究と仕事との両立を御理解、御支援頂きました、株式会社 Yell Holdings 濱田篤秀社長、株式会社 Yell Pharmacy 宅間大祐社長、同 平松久嗣前社長、株式会社ドラッグファーム 門田幹夫社長、株式会社メディコ 門田裕水社長、に、深謝致します。

さらに、多忙な職場環境にも関わらず、御理解頂きました、エール薬局グループ職員一同、M&D 調剤グループ職員一同に、厚く感謝致します。

最後に、医師として多忙な中、進学をサポートしてくれた妻 真由子、息子大幹と琢功実の笑顔、両親、義父母等多くの方々の支えにより、本論文を成し遂げることができたことに、感謝の意を述べたいと思います。